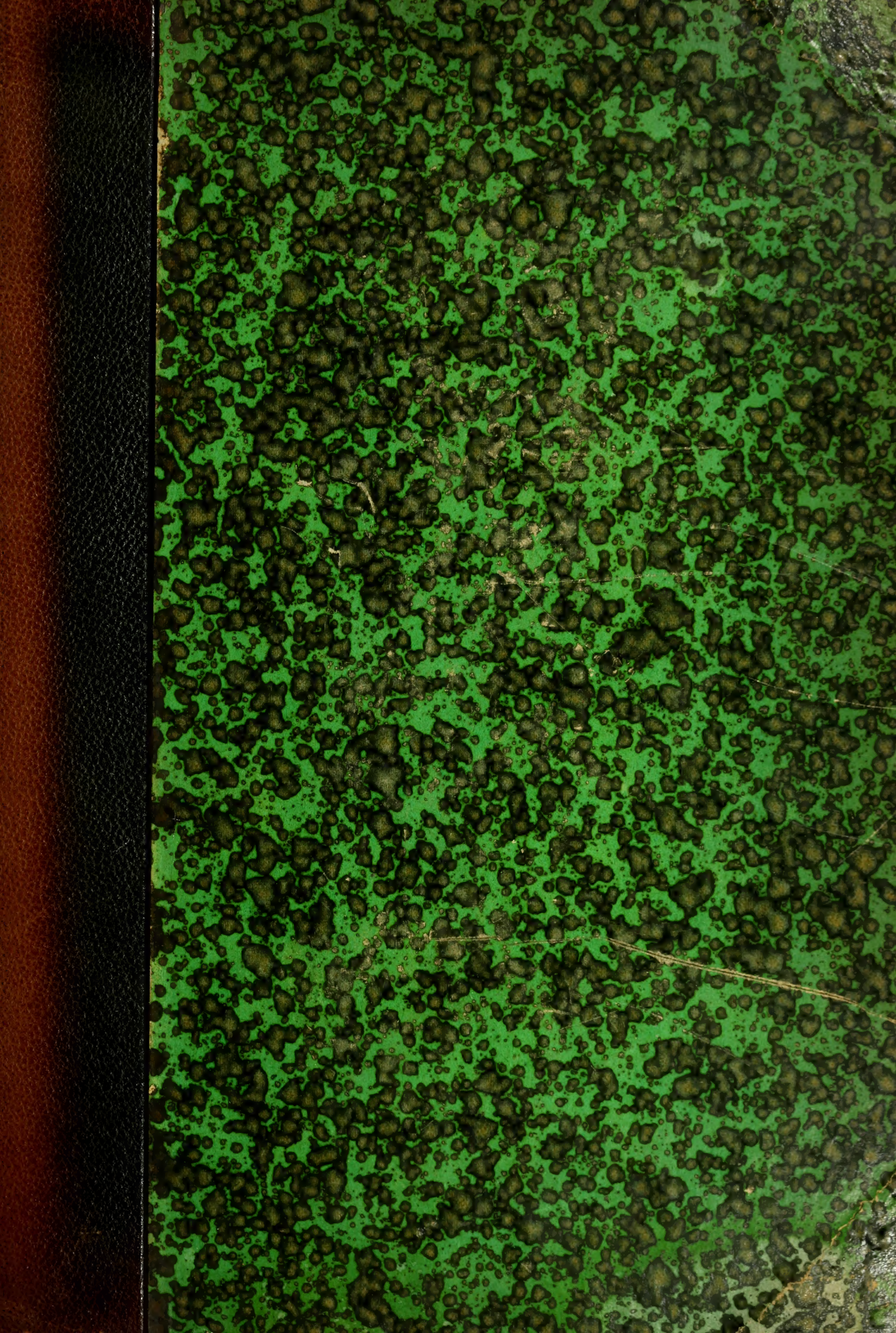
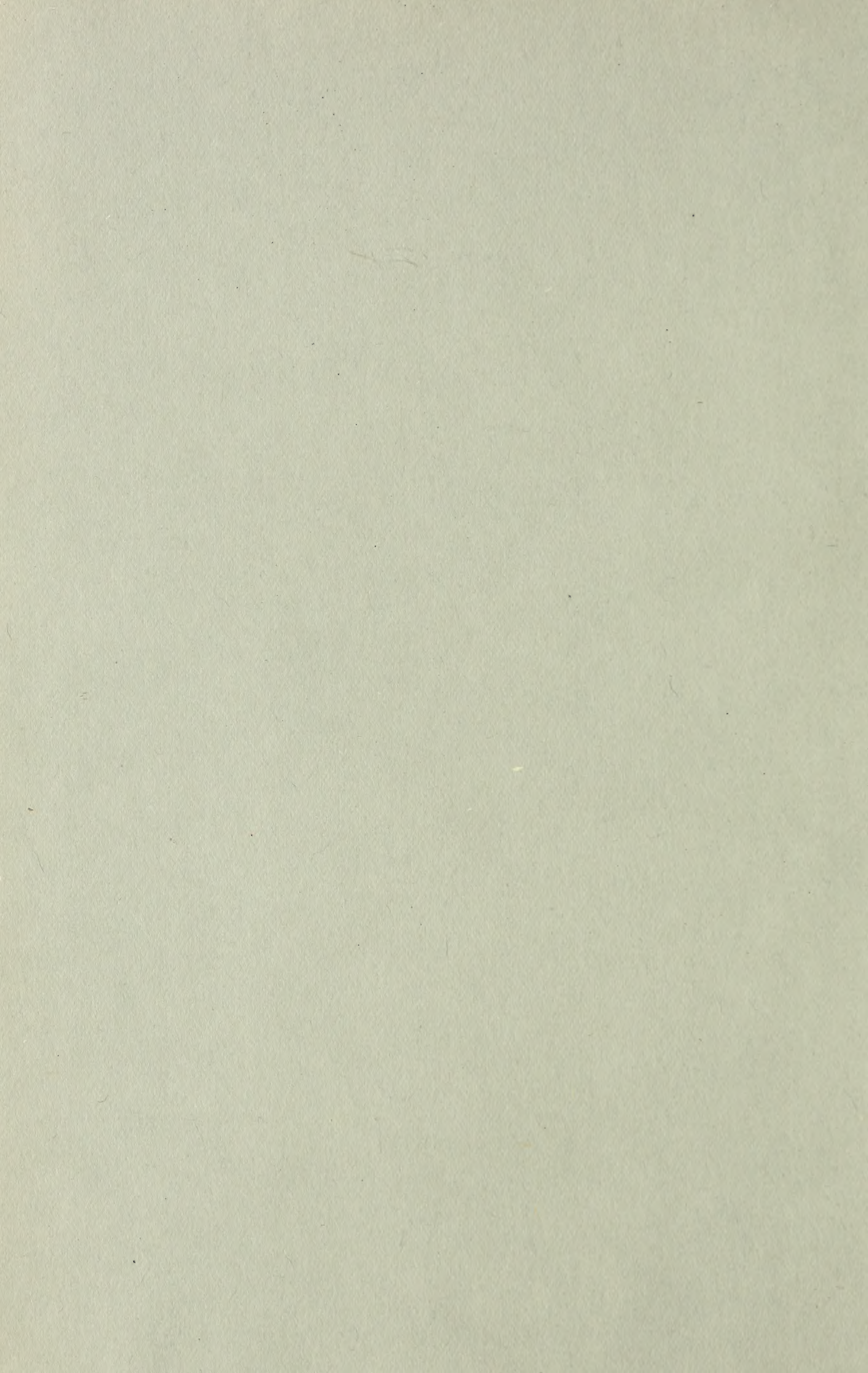








Zeitschrift
für
Immunitätsforschung
und experimentelle Therapie
I. Teil: Originale

unter Mitwirkung von

herausgegeben von

E. FRIEDBERGER (Greifswald.) **R. KRAUS** (Sao Paolo.) **H. SACHS** (Heidelberg.) **P. UHLENHUTH** (Marburg a. L.)

Dreiunddreißigster Band

Mit 17 Abbildungen und 15 Kurven im Text



Jena
Verlag von Gustav Fischer
1922

Inhaltsverzeichnis.

Heft 1	(S. 1—114)	ausgegeben am	4. November 1921.
„ 2	(S. 115—196)	„ „	18. November 1921.
„ 3	(S. 197—296)	„ „	7. Dezember 1921.
„ 4/5	(S. 297—442)	„ „	30. Dezember 1921.
„ 6	(S. 443—580)	„ „	19. Januar 1922.

Zeitschrift f. Immunitätsforschung. Originale. Bd. 33. Heft 1.

[Aus dem Staatlichen Hygienischen Institut zu Hamburg
(Direktor: Prof. Dr. Dunbar).]

Beitrag zur Frage der Komplementauswertung bei der Wassermannschen Reaktion.

Von Prof. Dr. **W. Gaehtgens.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 17. Mai 1921.)

Die Wassermannsche Reaktion ist, wie kaum eine andere serodiagnostische Methode, seit ihrer Entdeckung durch v. Wassermann, Neißer und Bruck Allgemeingut der gesamten Aerzteschaft geworden. Ihrer Bedeutung für die Diagnose und Therapie der Syphilis hat auch die Erkenntnis, daß es sich nicht um eine streng spezifische Reaktion im biologischen Sinne, sondern nur um ein für Syphilis charakteristisches Phänomen handle, keinen Abbruch tun können. Schwerwiegender waren die Einwände, die sich auf das gelegentliche Versagen und das Vorkommen unspezifischer Reaktionen bezogen und die vor allem die praktische Brauchbarkeit der Methode in Frage stellten, weil nicht selten die Untersuchung desselben Serums an verschiedenen Untersuchungsstellen zu entgegengesetzten Resultaten geführt hatte. Wassermann (1) hat demgegenüber den Nachweis zu führen gesucht, daß für die letztgenannten Unstimmigkeiten nur die verschiedene Ausführung der Untersuchung verantwortlich zu machen sei und daß die Originalmethode eine beinahe absolute Sicherheit für übereinstimmende Resultate biete, sofern sie von den verschiedenen Untersuchern auch völlig übereinstimmend ausgeführt wird. Um diese Uebereinstimmung weitgehend zu gewährleisten, wurde im Kriege durch eine Verfügung des Preußischen Kriegsministeriums die Original-Wassermann-Methode bei allen Heeresuntersuchungsstellen obligatorisch eingeführt und die Benutzung einheitlich geprüfter spezifischer

Extrakte und Hammelblutambozeptoren zur Vorschrift gemacht. Nur Komplement und Hammelblut waren von den Untersuchungsstellen selbst zu beschaffen.

Später ist in der Sitzung des Reichsgesundheitsrates vom 11. Juli 1919 eine neue Anleitung für die Ausführung der Wassermannschen Reaktion festgestellt worden. Gegenüber der alten Vorschrift bedeutet sie insofern einen Fortschritt, als sie genauere Einzelheiten über die Einstellung des Ambozeptors bringt und vor allem auch die Besonderheit des jeweils angewandten Komplementes durch Austitrierung und Anwendung auch der halben Komplementmenge bei entsprechend eingestelltem Ambozeptor mehr berücksichtigt, als das früher der Fall war. Zweifellos ist bei dieser Anordnung und alleiniger Benutzung der staatlich geprüften Extrakte und Ambozeptoren eine bessere Uebereinstimmung der Resultate verschiedener Untersuchungsstellen zu erwarten. Ob indes dadurch die Mängel, die der Originalmethode nach dem Urteil der meisten Autoren anhaften, hinreichend beseitigt werden, muß höchst zweifelhaft erscheinen. Der Erkenntnis dieses Umstandes ist es vielleicht zuzuschreiben, daß nach dem Rundschreiben des Reichsministers des Innern an die Landesregierungen vom 27. März 1920 die Anleitung kein starres, unabänderliches Schema zur Ausführung der Wassermannschen Reaktion bilden, sondern nur die Mindestforderungen für gewerbsmäßige, öffentliche und amtliche Untersuchungen enthalten soll. Bei Untersuchungen für private Zwecke soll es dem Untersucher dagegen unbenommen sein, auch andere Arten des Verfahrens in Anwendung zu bringen.

Wenn Lange (2) in Vertretung der Wassermannschen Schule den Standpunkt einnimmt, daß die Originaltechnik bei Beachtung sämtlicher vorgeschriebener Details auch in den feinsten quantitativen Verhältnissen genau ausbalanciert sei und keiner Verbesserungen bedarf, so setzt er sich damit in Widerspruch zum Urteil der meisten anderen Serologen. Gerade die Unzulänglichkeiten der Originalmethode haben dazu geführt, daß immer wieder Modifikationen und Verbesserungen angegeben wurden, welche teils die Technik vereinfachen, teils die Empfindlichkeit des Verfahrens steigern sollten. Die Originalmethode wendet als rein qualitative diagnostische Re-

aktion unter Verzicht auf jede quantitative Auswertung alle Reagentien nur in einer Gebrauchsdosis an. Diese Versuchsanordnung bringt es mit sich, daß unter Umständen das eine oder andere der zur Untersuchung notwendigen Reagentien im Ueberschuß zur Verwendung kommt und dadurch der Ausfall der Reaktion entscheidend beeinflußt werden kann. Während Extrakt, Hammelblut und Ambozeptor relativ konstante Größen sind, stellt nach den Untersuchungen von Browning und Mc Kenzie (3), Facchini (4), Graetz (5), Kaup (6), Stern (7) u. a. das Komplement einen recht variablen Faktor dar, dessen Eigenart an jedem Versuchstage auf das sorgfältigste bestimmt und berücksichtigt werden muß. Geschieht das nicht, wie bei der Originalmethode, welche das Komplement in 2—5-fachem Ueberschuß verwendet, so treten Schwankungen der Resultate bei wiederholten Untersuchungen auf. Vor allem aber können sichere Syphilisfälle der Feststellung entgehen, wenn bei geringem Reaktionskörpergehalt die spezifische Bindung verdeckt wird, weil genügend Komplement für das hämolytische System frei bleibt. Wassermann (8) hat an dem bedeutenden Komplementüberschuß der Originalmethode festgehalten, weil er den Nachteil, daß der eine oder andere Syphilisfall der serologischen Feststellung entgeht, geringer veranschlagt als die Gefahr einer Häufung von unspezifischen Reaktionen, die sich beim Arbeiten mit verringerten Komplementmengen zumal bei ungeübten Untersuchern ergeben könnte. Demgegenüber ist darauf hinzuweisen, daß eine solche Vorsicht, so berechtigt sie an sich auch ist, andererseits nicht dazu führen sollte, auf den weiteren Ausbau des Verfahrens und die Beseitigung offensichtlicher Mängel zu verzichten. Die Gefahr unspezifischer Reaktionen, die gelegentlich ja auch bei der Originalmethode festgestellt werden, darf auch nicht überschätzt werden. Da es sich in derartigen zweifelhaften Fällen meist um Hemmungen geringeren Grades handelt, wird das Ergebnis ohnehin mit einer gewissen Vorsicht zu verwerten sein und in unklaren Fällen Anlaß zu einer nochmaligen Untersuchung geben. Ueberdies haben die zahlreichen Veröffentlichungen der letzten Jahre hinreichend zur Verbreitung der Kenntnis beigetragen, daß die Wassermannsche Reaktion wie jede andere biologische Reaktion ge-

legentlich versagen kann, und daß die Diagnose „Syphilis“ nicht vom Serologen, sondern vom Kliniker allein gestellt werden muß. Entscheidend für den Wert einer Modifikation darf aber schließlich allein das Urteil sein, das sich auf Grund ausgedehnter vergleichender Untersuchungen mit der Originalmethode unter sorgfältiger Berücksichtigung des jeweiligen klinischen Befundes ergibt.

So wird es verständlich, daß von vielen Seiten an dem weiteren Ausbau und der Verfeinerung des Originalverfahrens eifrig gearbeitet worden ist, um auch diejenigen Fälle, die sich bei der Originalmethode als negativ erwiesen hatten, der serologischen Feststellung zugänglich zu machen. Diese Bestrebungen haben zwei verschiedene Richtungen eingeschlagen. Auf der einen Seite wurde die Untersuchung quantitativ ausgeführt durch Abstufung der im Versuch angewandten Serum- oder Extraktmengen, um auf diese Weise Einblick in die Stärke des betreffenden Krankenserums zu gewinnen. Eine eigentliche Verfeinerung nach der diagnostischen Seite wurde dabei allerdings nicht erzielt, abgesehen von der erhöhten Sicherheit, die eine quantitativ genau und regelmäßig abfallende Reihe, besonders in klinisch zweifelhaften Fällen, gegenüber einem einzelnen Untersuchungsröhrchen bieten kann.

Eine größere Empfindlichkeit der Reaktion wurde andererseits angestrebt durch Aenderungen am hämolytischen System bzw. durch Erhöhung der Dosen des zu prüfenden Serums. Methoden, die durch Bestimmung des zur völligen Hämolyse gerade notwendigen Komplementbedarfs und stufenweise Erhöhung dieses Minimums quantitativ und gleichzeitig qualitativ empfindlicher arbeiten, sind schon im Jahre 1909 von Zeißler (9) sowie Browning und Mc Kenzie (3) angegeben worden, haben aber keine weitere Verbreitung gefunden. In neuerer Zeit hat Kaup (6) die Frage der Komplementabstufung aufs neue zum Gegenstand eingehender Untersuchungen gemacht und eine Methodik angegeben, die klar und zweckmäßig aufgebaut ist und theoretisch allen Anforderungen weitgehend gerecht zu werden scheint.

Die Gründe, welche Kaup zur Abänderung der Originalmethode veranlaßt haben, sind: 1) das reziproke Verhältnis zwischen den zur kompletten Hämolyse erforderlichen Mengen

von Ambozeptor und Komplement, 2) das starke Schwanken der lytischen Wirkung des aktiven Meerschweinchenserums, 3) die wechselnde Stärke der Eigenhemmung des Patientenserums, 4) das Schwanken der eiweißfällenden und hämolytischen, teilweise hemmenden Wirkung der Organextrakte und 5) die Wirkung der Patientensera auf die Extrakte.

Kaup wendet für die Auswertung des Komplementes die 4-fache Ambozeptortiterdosis an, d. h. das 4-fache derjenigen Ambozeptorverdünnung, die bei Gegenwart von 0,5 ccm Komplement (1 : 10) 0,5 ccm 5-proz. Hammelblutes gerade noch völlig aufzulösen vermag. Falls das Komplement eigenen hämolytischen Ambozeptor enthält, wird das Doppelte derjenigen Menge Immun-Ambozeptor genommen, die mit 0,1 oder 0,2 ccm Komplement völlige Hämolyse ergeben hat. Die Titrierung des Komplementes erfolgt in 4 Reihen zu 6—10 Röhrchen. In der ersten wird das Komplement allein mit Ambozeptor und Hammelblut untersucht, in der zweiten in Gegenwart von Normalserum, in der dritten in Gegenwart eines Extraktes und in der vierten in Gegenwart eines Gemisches von Normalserum und Extrakt. Für die Praxis genügt die Bestimmung des Titers mit dem Komplement allein und mit dem Gemisch Extrakt + Serum, so daß die zweite und dritte Reihe fortfallen können. Als Normalserum wird ein Serum verwendet, das mit dem gewöhnlichen Komplementtiter keine oder nur eine Spur einer Eigenhemmung zeigt und gewöhnlich auf die Extrakteigenhemmung einen Einfluß ausübt. Diejenige geringste Komplementmenge, die in der vierten Reihe zur Lösung erforderlich ist, wird als Komplementeinheit bezeichnet und als Minimaldosis im Hauptversuch benutzt.

Im Hauptversuch wird an steigenden Komplementdosen festgestellt, wieviel Einheiten vom Patientenserum im Maximum gebunden werden. Hierzu werden für jedes Serum im allgemeinen 8 Röhrchen angesetzt, von denen 5 der eigentlichen Untersuchung dienen, während 3 Serumkontrollen sind. Die ersten 5 Röhrchen enthalten die üblichen Mengen (0,5 ccm) von Patientenserum 1 : 5 und Extrakt, das erste von ihnen außerdem die im Vorversuch bestimmte Komplementeinheit, während den übrigen 4 die $1^1/_2$-, 2-, 3- und 4-fache Komplementmenge zugefügt wird. Die 3 Serumkontrollen werden mit den-

selben Komplementdosen wie die ersten 3 Versuchsröhrchen beschickt. Auf die früher übliche Extraktkontrolle verzichtet Kaup, da nach seinen Beobachtungen die Extrakthemmung sich der Serumeigenhemmung nicht hinzuaddiert, sondern vielmehr durch die Serumeinwirkung im allgemeinen herabgesetzt wird. Deshalb wird im Hauptversuch nur eine aus 3 Röhrchen bestehende Extrakt-Normalserum-Kontrolle angesetzt, um nachzuweisen, daß der Komplementtiter im wesentlichen unverändert geblieben ist. Das erste Röhrchen erhält die doppelte Extraktmenge, 0,1 Normalserum und die einfache Komplementdosis, das zweite und dritte die einfache Extraktmenge, 0,1 Normalserum und die einfache bzw. $1\frac{1}{2}$-fache Komplementdosis. Die im Hauptversuch wiederholte, ebenfalls 3 Röhrchen umfassende Systemkontrolle enthält im ersten Röhrchen die halbe, im zweiten die ganze und im dritten die $1\frac{1}{2}$-fache Komplementeinheit. Nach $\frac{1}{2}$—$\frac{3}{4}$-stündiger Bindung bei 37° werden diesen Gemischen sensibilisierte Hammelblutkörperchen zugesetzt und nach $\frac{1}{2}$-stündiger Bebrütung die Ergebnisse vorläufig abgelesen. Nach einer weiteren Stunde bei Zimmertemperatur oder am nächsten Morgen wird dann endgültig festgestellt, ob und wieviel Komplementeinheiten von dem betreffenden Serum gebunden worden sind.

Die Merkmale, welche die Kaupsche Methode von dem Originalverfahren und anderen Abänderungsvorschlägen unterscheiden, sind demnach 1) genaue Bestimmung der Komplementeinheit als Grundlage, 2) Berücksichtigung der Extrakt- und Serumwirkung bei Feststellung der Komplementeinheit, 3) Vermeidung eines Komplementüberschusses im Hauptversuch, 4) Anwendung konstanter Extrakt- und Serummengen bei steigenden Komplementmengen zur quantitativen Bestimmung der spezifischen Komplementbindung, 5) Einschaltung einer besonderen Serumkontrolle mit ähnlich ansteigenden Komplementeinheiten, 6) Ersatz der Extraktkontrolle durch eine Extrakt-Serumkontrolle beim Hauptversuch und schließlich 7) Beurteilung des quantitativen Ergebnisses unter Berücksichtigung der Serumeigenhemmung. Für die Untersuchung des Serums genügt nach Kaup die Anwendung eines einzigen Extraktes, dessen Einstellung nach einem besonderen Verfahren erfolgt, auf das näher einzugehen sich hier erübrigt.

Als Vorzüge seiner Methodik bezeichnet Kaup die erhöhte Empfindlichkeit der Reaktion, die Vermeidung von Störungen durch unspezifische Hemmungen, die quantitative Wertung des Grades der spezifischen Einwirkung und die Erleichterung der Durchführung durch Beschränkung auf einen spezifischen Extrakt und Wegfall der Vergleichssera. Die Ueberlegenheit seines Verfahrens über die Originalmethode hat Kaup durch ausgedehnte, an verschiedenen Orten ausgeführte Paralleluntersuchungen nachzuweisen gesucht. Es zeigte sich dabei, daß in der Tat die positiven Resultate nach Kaup die Zahl der positiven Ergebnisse nach Wassermann um 6—9 Proz., bei den in Teschen ausgeführten Untersuchungen sogar um 27 Proz. übertrafen. Unspezifische Hemmungen spielten dabei keine größere Rolle als bei der Originalmethode, während die Zahl der zweifelhaften Befunde bei dem Kaupschen Verfahren allerdings höher ausfiel.

Die Angaben und Abänderungsvorschläge Kaups haben nicht allgemeine Zustimmung gefunden. R. Müller (10) äußert Bedenken gegen die Verwendung des Komplementminimums, weil auch Sera von Gesunden und nichtluetischen Kranken Bindungsreaktionen schwächeren Grades mit Lipoiden geben können. Zu einer Ablehnung der Kaupschen Methode gelangt auch v. Kaufmann (11), obwohl er ihre Spezifität nicht bezweifelt und unter 108 Fällen, sofern mit gleichen Extrakten gearbeitet wurde, bei Verwendung der K.-W.-J.-Extrakte in 6 Fällen und bei Verwendung der Frankfurter Extrakte in 3 Fällen eine stärkere Reaktion nach Kaup feststellen konnte. Nach seiner Ansicht ist aber die Auswertung des Komplementes allein doch nicht imstande, die biologischen Verschiedenheiten der Antigene völlig auszugleichen. Um einen gleichmäßigen Ausfall der Reaktion zu erhalten, müsse vielmehr auch die Extraktqualität berücksichtigt werden. Auch Sachs (12) verspricht sich keine besonderen Vorteile von der Kaupschen Modifikation, obwohl er sich von ihrer Zuverlässigkeit und von der Empfindlichkeitssteigerung bei Verwendung nichtcholesterinierter Extrakte hat überzeugen können. Andererseits waren aber die Resultate, die er mit der Frankfurter Methode und geeigneten cholesterinierten Extrakten erhielt, nicht weniger günstig. Auch er stellt die Herstellung

möglichst empfindlicher Extrakte in den Vordergrund. Stern und Danziger (13), welche die Gleichwertigkeit des Kaupschen Verfahrens und der Breslauer Methode mit inaktivem Serum feststellten, konnten keine positive Reaktion nach Kaup beobachten, die nicht als spezifisch hätte gelten müssen. Gröbere Unstimmigkeiten wurden nach der Kaupschen Methodik vermieden, wenn auch gelegentlich differente Resultate auftraten. Dagegen konnten die Verfasser nicht der Anschauung Kaups zustimmen, daß ein einziger spezifischer Extrakt genügende Sicherheit der Untersuchungsergebnisse zu gewährleisten vermöge. Nach den Untersuchungen von Keresztes (14) und Hatziwassiliu (15) ist die Kaupsche Modifikation der Originalmethode zweifellos überlegen. Keresztes konnte unter 133 Fällen 11 Proz. mehr positive Reaktionen mit dem Kaupschen Verfahren nachweisen, Hatziwassiliu unter 165 Fällen 14 positive und 2 zweifelhafte Sera feststellen, die nach Wassermann negativ reagiert hatten. Beide Autoren geben an, daß diese Ergebnisse in Uebereinstimmung mit den klinischen Erscheinungen gestanden hätten, die Gefahr unspezifischer Bindungen mithin nicht zu bestehen scheine.

Das Gesamtresultat dieser Nachprüfungen, mögen sie auch im einzelnen das Verfahren kritisieren und für die Praxis ablehnen, läßt sich wohl dahin zusammenfassen, daß die Zuverlässigkeit und größere Empfindlichkeit der Kaupschen Modifikation im Vergleich zur Originalmethode als erwiesen gelten kann und daß unspezifische Hemmungen zumindest nicht in bemerkenswertem Maße bisher zur Beobachtung gelangt sind. Zu dem gleichen Ergebnis führten auch orientierende Paralleluntersuchungen, die ich an 120 Serumproben nach der Original- und der Kaupschen Methode ausgeführt habe. Für diese Versuche benutzte ich einen cholesterinierten Luesherzextrakt, der in 30- bzw. 25-facher Verdünnung zur Verwendung kam. Allerdings hält Kaup (6) die cholesterinierten Extrakte für sein Verfahren für ungeeignet, weil der Cholesterinzusatz zwar die Eigenhämolyse der Extrakte vermindert, aber zugleich auch die Eigenhemmung und damit die Gefahr unspezifischer Reaktionen stark erhöht. Demgegen-

über hat Sachs (12) darauf hingewiesen, daß die antikomplementäre Wirkung geeignet hergestellter und erprobter cholesterinierter Extrakte keineswegs größer, meist sogar geringer ist als diejenige von Extrakten anderer Herkunft. Da sie zudem jede eigenhämolytische Wirkung vermissen lassen, müssen sie bei hinreichender Empfindlichkeit als besonders brauchbare Antigene bezeichnet werden. Da meine eigenen Erfahrungen nur geeignet sind, diese Ansicht von Sachs zu bestätigen, vermochte ich einen triftigen Hinderungsgrund für die Benutzung des erwähnten Extraktes in seinem Cholesteringehalt nicht zu erblicken. Ich entschloß mich um so lieber zu seiner Anwendung, als er neben hoher Empfindlichkeit, die mir im Hinblick auf die weiter unten folgenden Untersuchungen besonders erwünscht sein mußte, in den genannten Verdünnungen jede Eigenhämolyse und fast immer auch jede nennenswerte Eigenhemmung vermissen ließ.

Abgesehen von dem eben besprochenen Punkt habe ich mich genau an die Vorschriften von Kaup gehalten. Im Gegensatz zu Sachs konnte ich feststellen, daß auch bei Verwendung eines cholesterinierten Extraktes die Vorzüge des Kaupschen Verfahrens unverkennbar zutage treten. Von den 120 Fällen fielen übereinstimmend nach Kaup und Wassermann 39 positiv und 74 negativ aus. Von den übrigen 7 nach Wassermann negativen Proben reagierten nach Kaup 6 mehr oder weniger deutlich positiv und eine zweifelhaft. In 6 von diesen Fällen lag behandelte Lues vor, während die siebente Serumprobe ohne klinische Diagnose eingeschickt worden war. Die höhere Empfindlichkeit der Modifikation ließ sich ferner in 8 von den 39 positiven Fällen feststellen, die nach der Originalmethode nur schwach positiv bzw. zweifelhaft reagierten, während nach Kaup eine ausgesprochen positive Reaktion auftrat. Soweit sich auf Grund einer relativ beschränkten Zahl von Untersuchungen ein Urteil abgeben läßt, komme ich demnach zu dem Schluß, daß die Kaupsche Versuchsanordnung die Empfindlichkeit der Komplementbindungsreaktion auch bei Verwendung eines cholesterinierten Luesherzextraktes nicht unwesentlich zu steigern vermag, ohne ihre Spezifität zu beeinträchtigen.

Trotz dieser unverkennbaren Vorzüge haften der Kaupschen Modifikation aber auch Mängel an, die es mir zweifelhaft erscheinen lassen, ob sie neben der Originalmethode, die ja für gewerbsmäßige, amtliche und öffentliche Untersuchungen jetzt vorgeschrieben ist, als Ergänzung und Kontrolle weitere Verbreitung finden wird. Einerseits ist die Technik recht umständlich und erfordert von den einzelnen Reagentien zu viel Material, um sich an stark beschäftigten Untersuchungsstellen neben dem vorgeschriebenen Verfahren regelmäßig ohne weiteres durchführen zu lassen.

Wichtiger als dieser Punkt erscheint mir andererseits die Art, wie das Komplementminimum für den Hauptversuch bestimmt wird. Kaup nimmt, wie bereits oben auseinandergesetzt, diese Auswertung in der Weise vor, daß er fallende Komplementmengen mit einem Gemisch von Normalserum + Extrakt versetzt und als Komplementeinheit für den Hauptversuch diejenige Dosis benutzt, die noch eben zur völligen Hämolyse ausgereicht hat. Er geht dabei von der Beobachtung aus, daß das Normalserum die eigenhemmende Wirkung des Extraktes aufzuheben vermag. Auch Ritz und Sachs (16) haben angegeben, daß das Serum als solches antikomplementäre Extraktfunktionen herabsetzen kann. Kaup bezeichnet demgemäß im Hauptversuch jede Hemmung als spezifisch, wenn die mit der gleichen Komplementmenge versehene Serumkontrolle völlig gelöst ist. Ein solches Vorgehen wäre berechtigt, wenn dieser schützende Einfluß des Normalserums immer ein streng gesetzmäßiges Verhalten in der geschilderten Weise zeigen würde. Nach den umfangreichen Untersuchungen Kaups mit 50 spezifischen und 40 unspezifischen Extrakten wäre dies in der Tat anzunehmen. Andererseits ist aber auf Grund Kaups eigener Angaben nicht mit Sicherheit auszuschließen, daß unter Umständen diese Einwirkung auch ausbleiben kann. Er selbst empfiehlt (p. 91 seiner Monographie) für die Feststellung des Komplementtiters die Verwendung eines Normalserums, „das mit dem gewöhnlichen Komplementtiter keine oder nur eine Spur einer Eigenhemmung zeigt und gewöhnlich[1]) auf die Extrakteigenhemmung einen

1) Im Original nicht gesperrt gedruckt.

Einfluß ausübt". Ob allerdings Kaup Ausnahmen von dieser Regel beobachtet hat, geht aus seinen weiteren Ausführungen nicht hervor. Der zitierte Satz läßt jedenfalls aber diese Möglichkeit nicht mit Sicherheit ausschließen. Trifft die Annahme, daß die schützende Wirkung des Normalserums unter Umständen ausbleiben kann, in der Tat zu, so könnten in solchen Fällen Hemmungen der Hämolyse im Hauptversuch auftreten, die nicht auf eine spezifische Bindung, sondern lediglich auf Eigenhemmung des Extraktes zurückzuführen wären und demgemäß als unspezifisch bezeichnet werden müßten. Trotzdem meine oben mitgeteilten Untersuchungen in Uebereinstimmung mit den Beobachtungen anderer Autoren ergeben haben, daß diese Gefahr praktisch keine nennenswerte Rolle zu spielen scheint, glaube ich darauf hinweisen zu müssen, da ich gar nicht selten, wenigstens bei Benutzung von Extrakten ohne bzw. mit geringer Eigenhemmung, diese Kaupsche Regel nicht bestätigen konnte.

Um das oben Gesagte zu veranschaulichen, führe ich aus meinen zahlreichen Untersuchungen ein Beispiel an, dessen Ergebnisse in Tabelle I zusammengestellt sind. Hinsichtlich der Methodik sei bemerkt, daß in allen Versuchen mit halben

Tabelle I.

Reihe	Gemisch	Komplement (1:10)					
		0,3	0,25	0,2	0,15	0,1	0,05
1	1 ccm NaCl-Lösung (Komplementkontrolle)	θ	θ	θ	θ	θ	++
2	0,5 „ Normalserum 1:5 + 0,5 ccm NaCl-Lösung	θ	θ	θ	θ	θ	+++
3	0,5 „ „ 1:5 + 0,5 „ Luesherzextrakt I ohne Cholest. 1:10	θ	θ	θ	θ	θ	+++
4	0,5 „ NaCl + 0,5 „ „ I „ „ 1:10	θ	θ	θ	θ	+	+++
5	0,5 „ Normalserum 1:5 + 0,5 „ „ I mit „ 1:25	θ	θ	θ	θ	+	+++
6	0,5 „ NaCl + 0,5 „ „ I „ „ 1:25	θ	θ	θ	θ	θ	+++
7	0,5 „ Normalserum 1:5 + 0,5 „ „ VI ohne „ 1:5	θ	θ	θ	θ	+	+++
8	0,5 „ NaCl + 0,5 „ „ VI „ „ 1:5	θ	θ	θ	θ	+	+++
9	0,5 „ Normalserum 1:5 + 0,5 „ „ VI mit „ 1:10	θ	θ	θ	θ	+	+++
10	0,5 „ NaCl + 0,5 „ „ VI „ „ 1:10	θ	θ	θ	θ	±	+++
11	0,5 „ Normalserum 1:5 + 0,5 „ Rinderherzextr. IX ohne „ 1:6	θ	θ	θ	θ	±	+++
12	0,5 „ NaCl + 0,5 „ „ IX „ „ 1:6	θ	θ	θ	θ	θ	+++
13	0,5 „ Normalserum 1:5 + 0,5 „ Luesherzextrakt X „ „ 1:6	θ	θ	θ	θ	±	+++
14	0,5 „ NaCl + 0,5 „ „ X „ „ 1:6	θ	θ	θ	θ	θ	+++

Zeichenerklärung: +++ = komplette Hemmung der Hämolyse, ++ = fast komplette Hemmung der Hämolyse, + = schwache Hemmung der Hämolyse, ± = Spur Hemmung der Hämolyse, θ = vollständige Hämolyse.

Dosen (Gesamtmenge 2,5 ccm) gearbeitet wurde. Als Normalserum wurde in allen Reihen dasselbe wassermannnegative Serum, das keine Eigenhemmung zeigte, verwendet. Zu 0,5 ccm dieses auf 1 : 5 verdünnten Serums wurden 0,5 ccm der verschiedenen Extrakte in den angegebenen Verdünnungen hinzugefügt und dieses Gemisch mit fallenden Komplementmengen versetzt. Nach halbstündigem Aufenthalt im Wasserbad (37 °) erhielten alle Röhrchen den üblichen Zusatz von Ambozeptor und Hammelblut, kamen dann wieder für eine halbe Stunde ins Wasserbad, wurden hierauf vorläufig und am anderen Morgen endgültig beurteilt. In ähnlicher Weise wurden gleichzeitig die Extraktkontrollen ohne Serum, die Serum- und Komplementkontrollen behandelt.

In diesem Falle hatte, wie der ersten Reihe zu entnehmen ist, 0,1 ccm Komplement (1 : 10) genügt, um das hämolytische System bereits nach einer halben Stunde zur Lösung zu bringen. Der Zusatz von Normalserum allein (Reihe 2) hatte an diesen Verhältnissen nichts Wesentliches geändert. Wurde dagegen der auf 1 : 10 verdünnte, nicht cholesterinierte Luesherzextrakt I allein dem Komplement (Reihe 4) zugefügt, so trat eine geringe hemmende Wirkung des Extraktes unverkennbar zutage, indem zur Lösung des Hammelblutes nun 0,15 ccm erforderlich waren. Wurde dem Komplement außer dem Extrakt auch noch Normalserum zugesetzt (Reihe 3), so machte sich die von Kaup beobachtete schützende Serumwirkung geltend, das Komplementminimum sank wieder auf 0,1 ccm.

Wenn diese Beobachtung auch imstande ist, die Angaben Kaups vollkommen zu bestätigen, so wird aus den folgenden Reihen ersichtlich, daß *eine strenge Gesetzmäßigkeit in der Einwirkung des Serums auf Extrakte nicht vorzuliegen scheint.* Derselbe Luesherzextrakt I zeigte nach Zusatz von 0,1 Proz. Cholesterin in der Verdünnung 1 : 25 ein entgegengesetztes Verhalten. Während er dem hämolytischen System gegenüber an und für sich jede Eigenhemmung vermissen ließ (Reihe 6), war der Komplementbedarf nach Zusatz von Normalserum deutlich erhöht (Reihe 5). Wieder anders verhielt sich der Luesherzextrakt VI, der sowohl mit als auch ohne Cholesterin eine deutliche Eigenhemmung aufwies, die auch durch den Zusatz von Normalserum nicht

beseitigt wurde (Reihe 7—10). Der Rinderherzextrakt IX und der Luesherzextrakt X, beide ohne Cholesterin, wiesen schließlich allein keine Eigenhemmung auf, benötigten aber nach Zusatz von Normalserum wieder eine etwas größere Komplementmenge zur völligen Hämolyse (Reihe 11—14). Ergänzend sei noch bemerkt, daß sämtliche Extrakte, wie besondere, in der Tabelle nicht aufgeführte Kontrollversuche ergaben, jede Spur von Eigenhämolyse vermissen ließen.

Wenn auch die angeführten Unterschiede im Komplementbedarf nur relativ gering sind, so kehren sie doch zu häufig wieder, um sich als bloße Zufälligkeiten erklären zu lassen. Unnötig zu bemerken ist es, daß sämtliche Reihen gleichzeitig mit den gleichen Reagentien angesetzt wurden, so daß also auch etwaige Schwankungen des Komplements mit Sicherheit ausgeschlossen werden können, und daß ferner auf die sorgfältige Ausmessung aller Flüssigkeitsmengen besonderes Gewicht gelegt wurde. Käme der schützenden Serumwirkung ein streng gesetzmäßiges Verhalten zu, so hätten nach Kaup die in Reihe 5, 11 und 13 aufgetretenen Hemmungen zwar nicht als positive, aber doch als zweifelhafte Reaktionen von spezifischer Art angesprochen werden müssen. Die Folge wäre also eine unrichtige Beurteilung gewesen, denn es handelte sich, wie ja auch die übrigen Versuchsreihen einwandfrei beweisen, um ein sicher negatives Serum. In diesem Zusammenhang sei auch auf die Untersuchungen von v. Wassermann und Citron (17) verwiesen, welche nach Kombination von Glykogen, Pepton u. a. mit normalem inaktivierten Kaninchenserum (beide Reagentien in an und für sich indifferenten Mengen) eine deutliche Komplementbindung feststellen konnten. Ebenso beobachteten sie, daß eine nicht mehr hemmende Dosis von Lecithin nach Mischung mit inaktivem frischen Normalserum gelegentlich ganz schwache Hemmungen der Hämolyse bewirkt.

Das Gesamtergebnis des Versuches muß demnach dahin zusammengefaßt werden, daß die Kaupsche Regel von der schützenden Wirkung des Normalserums auf Extrakte nicht in allen Fällen zu Recht besteht. Wie hier gleich bemerkt sei, habe ich diese Erfahrungen bei zahlreichen weiteren Untersuchungen

bestätigt gefunden. Oftmals trat die Aufhebung der Extrakthemmung nach Zusatz von Normalserum unverkennbar zutage, häufig ließ sich aber auch das im obigen Versuch geschilderte entgegengesetzte Verhalten feststellen.

Fragen wir nach der Ursache dieser regelwidrigen Erscheinung, so scheinen mir die vorliegenden Beobachtungen geeignet, gewisse Anhaltspunkte für die Beantwortung dieser Frage zu geben. Da der Versuch mit demselben Normalserum und dem gleichen Komplement ausgeführt wurde, liegt es nahe, vor allem individuelle Verschiedenheiten der Extrakte dafür verantwortlich zu machen. Dem Cholesterin als solchem kommt eine besondere Bedeutung in dieser Hinsicht nicht zu, da auch nicht cholesterinierte Extrakte dieses atypische Verhalten aufwiesen. Ebensowenig scheint die Herkunft der Extrakte von Belang, da sowohl spezifische als auch unspezifische sich ähnlich verhielten. Wahrscheinlich werden der verschiedene Gehalt an lipoiden Substanzen und die gegenseitige Mischung dieser Stoffe im Extrakt die Serumwirkung verschieden zu beeinflussen vermögen. Möglicherweise spielen auch gewisse unkontrollierbare Verschiedenheiten in der Art der jeweiligen Extraktverdünnung eine Rolle (alle Verdünnungen wurden fraktioniert hergestellt). Daß schließlich aber unter Umständen auch die Eigenart des Normalserums oder des Komplementes von Bedeutung sein könnte, zeigte mir die oft wiederholte Beobachtung, daß zuweilen auch bei Verwendung des cholesterinierten Luesherzextraktes I die schützende Wirkung des Normalserums unverkennbar zutage trat.

Wenn ich auch auf Grund meiner vergleichenden Untersuchungen dem gelegentlichen Ausbleiben der schützenden Serumwirkung zunächst keine allzu große praktische Bedeutung zuschreiben möchte, so liegt hier doch die Möglichkeit einer Fehlerquelle, die zur Vorsicht mahnen muß. Nicht die Anwendung des geringsten Komplementbedarfes an sich ist es, gegen die sich meine Bedenken richten, sondern die Art der Bestimmung dieses Minimums. Die Berechtigung seiner Anwendung, die von manchen Autoren in Abrede gestellt wird, hat Kaup eingehend und meines Erachtens überzeugend begründet, seine Ablehnung hieße auf die feinsten Ausschläge der Komplementbindungsreaktion Vericht leisten. Eine solche

Vorsicht würde indes erst dann geboten sein, wenn der Nachweis geführt wäre, daß in der Tat bei dieser Versuchsanordnung eine Häufung von unspezifischen Reaktionen zu befürchten wäre. Nach den bisherigen Erfahrungen der verschiedensten Autoren scheint das allerdings nicht der Fall zu sein.

Der wesentlichste Fortschritt der Kaupschen Modifikation liegt in der Auswertung des Komplementes in Gegenwart von Normalserum und Extrakt. Bisher war es wohl allgemein üblich, das Komplement gesondert einerseits gegen das Patientenserum, andererseits gegen den Extrakt allein auszutitrieren und für den Hauptversuch ein Multiplum oder einen gewissen Ueberschuß des dabei festgestellten minimalen Wertes anzuwenden. Dieses Vorgehen mußte unvollkommen bleiben, weil es nicht die genau abgemessene Wirkung des im Hauptversuch untersuchten Gemisches Serum + Extrakt auf das Komplement berücksichtigen konnte, sondern immer mit einem mehr oder weniger großen Komplementüberschuß arbeitete. Diesen Verhältnissen hat Kaup Rechnung getragen und als Minimaldosis für den Hauptversuch diejenige Komplementmenge gewählt, die in Gegenwart von Normalserum und Extrakt noch gerade zur Lösung des hämolytischen Systems genügt. Die Schwäche dieser Anordnung liegt einmal darin, worauf schon R. Müller (10) sowie Stern und Danziger (13) hingewiesen haben, daß es ein Standardnormalserum, das ganz einwandfreie Resultate einer Titration in Gegenwart von Extrakt ermöglicht, nicht gibt. Wichtiger als dieser Einwand, dem mehr theoretische Bedeutung zukommt, scheint mir der durch meine obigen Untersuchungen geführte Nachweis zu sein, daß die Aufhebung der Extrakthemmnng durch die Wirkung des Serums, die Kaup zur Grundlage seiner Komplementauswertung macht, nicht in allen Fällen erfolgt. Es müßte vielmehr, streng genommen, für jedes Serum besonders der Nachweis geführt werden, daß es die Eigenhemmung des Extraktes in der Tat zu beseitigen vermag, um daraus den minimalen Komplementbedarf ableiten zu können. Das wäre natürlich nur bei negativen Serumproben möglich, bei allen positiven oder zweifelhalten aber ausgeschlossen, weil diese ja zusammen mit dem Extrakt die für Syphilis charakteristische Komplementbindung bewirken.

Ein Ausweg, für jedes Serum, gleichgültig ob positiv oder negativ, den minimalen Komplementbedarf einwandfrei zu bestimmen, wäre vorhanden, wenn es gelingt, den Extrakt durch eine indifferente Kontrollflüssigkeit zu ersetzen, die nur die eigenhemmende, nicht aber die gegenüber wassermannpositiven Seris charakteristische Extraktwirkung zur Geltung bringt. Es lag nahe, bei Versuchen, eine derartige Flüssigkeit herzustellen, zunächst an solche Stoffe zu denken, die schon normalerweise in allen Extrakten enthalten sind. Da als wirksame Bestandteile der für die Wassermannreaktion dienenden Organextrakte lipoidartige Stoffe zu gelten haben, schien es nicht ausgeschlossen, durch Variierung der Konzentration einer oder mehrerer dieser Substanzen zu einer Lösung zu gelangen, die den oben gestellten Bedindungen genügte.

Die Lipoide sind bekanntlich imstande, die Organextrakte bis zu einem gewissen Grade bei der Syphilisreaktion zu ersetzen. Zuerst wurde von v. Wassermann (18), Porges und Meier (19) das Lezithin als geeignet für diesen Zweck erwähnt. Sachs und Altmann (20) empfahlen das oleinsaure Natron, Sachs und Rondoni (21) ein Gemisch aus Lezithin, oleinsaurem Natrium und Oleinsäure, Fleischmann (22) Cholesterin und Vaseline, Desmoulière (23) ein Gemisch aus Cholesterin, Lezithin und entwässerte Natronseifenlösung. Die Erfahrungen mit diesen Stoffen haben indes ergeben, daß die Lipoide bzw. die Lipoid-Reaktionsgemische sich zwar bei der Wassermannschen Reaktion für Lues durchaus charakteristisch verhalten, aber nicht die Stärke der Organextrakte erreichen. Wenn demnach ihr Gebrauch als Extraktersatz praktisch weniger in Frage kommt, so sind sie doch in anderer Hinsicht von nicht geringer Bedeutung. Sachs (24) konnte nämlich nachweisen, daß es gelingt, durch geeignete Zusätze von Lipoiden nicht vollwirksame Extrakte aus luetischen und normalen Organen derart zu verstärken, daß sie den syphilitischen Organextrakten nicht nur gleichkommen, sondern sie sogar gelegentlich übertreffen. Als besonders brauchbares Corrigens bewährte sich das Cholesterin. Die Erwägung, daß das Cholesterin sich in

geeigneter Verdünnung vielleicht auch für die Herstellung einer indifferenten Kontrollflüssigkeit eignen könnte im Verein mit den überaus günstigen Erfahrungen, die ich in Uebereinstimmung mit zahlreichen anderen Autoren mit den cholesterinierten Extrakten gemacht, veranlaßten mich, mit ihm eine orientierende Untersuchung auszuführen.

Als Stammlösung benutzte ich eine 0,1-proz. alkoholische Cholesterinlösung, die durch fraktionierten Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung auf die gewünschten Verdünnungsgrade gebracht wurde. Als Kontrollen wurden gleichzeitig die entsprechenden Verdünnungen von 96-proz. Alkohol untersucht. Ein Vorversuch, dessen Ergebnisse in Tabelle II zusammengestellt sind, sollte zunächst das Verhalten derartiger Cholesterin- und Alkoholverdünnungen gegenüber einem wassermannpositiven und negativen Serum feststellen.

Tabelle II.

Gemisch $^1/_2$ Stunde bei 37°, dann Zusatz von Ambozeptor und Hammelblut	Cholesterinverdünnungen						Alkoholverdünnungen					
	1:2	1:4	1:8	1:20	1:20	1:25	1:2	1:4	1:8	1:10	1:20	1:25
0,5 ccm pos. Serum 1:5 + 0,5 ccm Kompl. 1:10	+++	+++	++	++	θ	θ	+++	θ	θ	θ	θ	θ
0,5 „ neg. „ 1:5 + 0,5 „ „ 1:10	+++	θ	θ	θ	θ	θ	+++	θ	θ	θ	θ	θ
0,5 „ NaCl + 0,5 „ „ 1:10	+++	θ	θ	θ	θ	θ	+++	θ	θ	θ	θ	θ

Wie Tabelle II, Reihe 3 zu entnehmen ist, hatten sowohl die Cholesterinlösung als auch der Alkohol in der Verdünnung 1:2 eine starke Eigenhemmung ausgeübt. In den höheren Verdünnungen traten eigenhemmende Eigenschaften bei der gewählten Komplementdosis dagegen nicht zu tage. Wurde dem Cholesterin ein wassermannpositives Serum zugesetzt, so ließ sich, in Bestätigung der Angaben Fleischmanns (22), eine ausgesprochene Komplementbindung bis zur 10-fachen Cholesterinverdünnung feststellen. In den Alkoholkontrollen war hingegen, abgesehen vom ersten Röhrchen, wo das Ausbleiben der Hämolyse auf die Eigenhemmung zurückzuführen ist, eine völlige Lösung des Hammelblutes erfolgt. Das negative Serum hatte demgegenüber weder mit Cholesterin noch mit Alkohol eine nennenswerte Komplementbindung herbeizuführen vermocht. Nur das mit 4-fach verdünnter

Cholesterinlösung und Serum beschickte Röhrchen wies eine leichte Hemmung der Hämolyse auf. Das Ausbleiben der Lösung in der ersten Probe war natürlich auch hier durch Eigenhemmung bedingt. Die beiden Sera wiesen, wie der Vollständigkeit halber erwähnt sei, keine Eigenhemmung auf.

Dieser Vorversuch hatte also bewiesen, daß einer 0,1-proz. alkoholischen Cholesterinlösung antigenartige Eigenschaften in der Art der Organextrakte zukommen. In stärkerer Konzentration äußern sich diese Funktionen auch gegenüber einem Normalserum durch partielle Komplementbindung. In höheren Verdünnungen tritt die antigene Wirkung nur gegenüber einem Syphilisserum in Erscheinung, um schließlich, wenn die Verdünnung noch weiter steigt (1 : 20 und 1 : 25), ganz zu verschwinden. Es läßt sich also in der Tat, wie Sachs und Altmann für das oleinsaure Natrium annehmen, die Reaktion zwischen Luesserum und Cholesterin als Ausdruck einer quantitativen Verschiebung bereits normalerweise bestehender Bedingungen ansprechen.

Die Tatsache, daß das Cholesterin in bestimmten Konzentrationen einen Organextrakt zu ersetzen vermag, läßt die Vermutung nicht unberechtigt erscheinen, daß es andererseits auch bestimmte Cholesterinabstufungen geben müsse, welche lediglich die eigenhemmende, nicht aber die spezifisch bindende Wirkung der Extrakte zum Ausdruck bringen. Um dies festzustellen, durfte aber nicht, wie im obigen Versuch, mit einem Komplementüberschuß gearbeitet werden. Nur bei Anwendung abgestufter Komplementmengen, welche die Eigenhemmung von Serum und Extrakt einwandfrei erkennen lassen, konnten derartige Funktionen des Cholesterins deutlich zutage treten. Ich habe deshalb im folgenden Versuche, dessen Ergebnisse in Tabelle III zusammengefaßt sind, ein Normalserum, verschiedene Cholesterinverdünnungen und fallende Komplementmengen $1/_2$ Stunde bei 37° aufeinander wirken lassen und dem Gemisch dann in der üblichen Weise Ambozeptor und Hammelblut zugesetzt. Zur Kontrolle wurde dasselbe Serum in einer zweiten Reihe mit den entsprechenden Alkoholverdünnungen behandelt.

Tabelle III.

Reihe	Gemisch		Komplement (1 : 10)								
			0,45	0,4	0,35	0,3	0,25	0,2	0,15	0,1	0,05
1	0,5 ccm [Normalserum 1 : 5] + 0,5 ccm NaCl		θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	+	+++
2	0,5 „ [Normalserum 1 : 5] + 0,5 „ [0,1-proz. Cholest.-Lösung]	1:4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3	0,5 „ [Normalserum 1 : 5] + 0,5 „ [0,1-proz. Cholest.-Lösung]	1:8	θ	θ	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
4	0,5 „ [Normalserum 1 : 5] + 0,5 „ [0,1-proz. Cholest.-Lösung]	1:10	θ	θ	±	+	++	++	+++	+++	+++
5	0,5 „ [Normalserum 1 : 5] + 0,5 „ [0,1-proz. Cholest.-Lösung]	1:20	θ	θ	θ	θ	θ	±	++	+++	+++
6	0,5 „ [Normalserum 1 : 5] + 0,5 „ [0,1-proz. Cholest.-Lösung]	1:25	θ	θ	θ	θ	θ	θ	+	+++	+++
7	0,5 „ [Normalserum 1 : 5] + 0,5 „ [96-proz. Alkohol]	1:4	θ	θ	θ	θ	θ	±	+	++	+++
8	0,5 „ [Normalserum 1 : 5] + 0,5 „ [96-proz. Alkohol]	1:8	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	+	+++
9	0,5 „ [Normalserum 1 : 5] + 0,5 „ [96-proz. Alkohol]	1:10	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	+	+++
10	0,5 „ [Normalserum 1 : 5] + 0,5 „ [96-proz. Alkohol]	1:20	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	+	+++
11	0,5 „ [Normalserum 1 : 5] + 0,5 „ [96-proz. Alkohol]	1:25	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	+	+++
12	0,5 „ [Normalserum 1 : 5] + 0,5 „ chol. Lues-herz-extr. I	1:25	θ	θ	θ	θ	θ	θ	+	+++	+++
13	0,5 „ NaCl + 0,5 „ dgl.	1:25	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	++	+++

Wie der ersten Reihe der Zusammenfassung zu entnehmen ist, waren in dem mit Normalserum allein beschickten Gemisch 0,15 ccm Komplement zur Lösung des hämolytischen Systems erforderlich. Die folgenden Reihen 2—6 zeigen, wie völlig anders sich das Ergebnis gestaltet, wenn dem Gemisch Cholesterin zugefügt wird. Die mit 4-fach verdünnter Cholesterinlösung angesetzten Proben weisen durchgehend eine komplette Hemmung auf. Werden dagegen höhere Cholesterinverdünnungen angewandt, so läßt sich ein allmähliches Sinken der Hemmungszone entsprechend dem jeweiligen stärkeren Verdünnungsgrade feststellen. Bei der Verdünnung 1 : 25 (Reihe 6) genügen 0,2 ccm Komplement zur völligen Hämolyse; etwa bei der Verdünnung 1 : 50 läßt sich ein Einfluß des Cholesterins nicht mehr nachweisen, wie mir weitere Versuche zeigten. Daß es sich bei den beobachteten Hemmungen in der Tat um eine Wirkung des Cholesterins handelt, geht aus den mit den entsprechenden Alkoholverdünnungen angesetzten Kontrollreihen 7—11 hervor. Zwar hat auch der Alkohol in 4-facher Verdünnung einen unverkennbar hemmenden Einfluß auszuüben vermocht, doch lassen alle weiteren Verdünnungen diese Funktion nicht mehr zutage treten. Wenn auch nach den Untersuchungen von Sachs und Rondoni (20) zu berücksichtigen ist, daß Alkohol in an sich in-

differenten Mengen die Reaktionsfähigkeit der Lipoide verstärkt, so ist diese Wirkung hier, zumal bei den höchsten Verdünnungen, wohl nur gering zu veranschlagen. Vornehmlich wird die geringe Hemmung in Reihe 5 und 6 dem Einfluß des Cholesterins allein zuzuschreiben sein.

Die durch die 25-fach verdünnte Cholesterinlösung verursachte Hemmung entspricht, wie Tabelle III weiter zu entnehmen ist, genau derjenigen, die der ebenfalls auf 1:25 verdünnte cholesterinierte Luesherzextrakt I im Verein mit Normalserum hervorgerufen hatte. Auch hier hatte dieser Extrakt, ebenso wie bei dem in Tabelle I wiedergegebenen Versuch, allein weniger Komplement gebunden als im Verein mit Normalserum.

Es hatte also in dem eben besprochenen Versuch eine 0,1-proz. alkoholische Cholesterinlösung die an eine indifferente Kontrollflüssigkeit zu stellenden Forderungen insofern erfüllt, als sie in 25-facher Verdünnung imstande war, lediglich die eigenhemmende Wirkung eines cholesterinierten Organextraktes, wie sie im Verein mit einem Normalserum sich äußerte, zum Ausdruck zu bringen. Mithin ließ sich erwarten, daß eine derartig verdünnte Cholesterinlösung ein geeignetes Mittel sein würde, um für jedes Serum, gleichgültig ob positiv oder negativ, den minimalen Komplementbedarf, der im Hauptversuch der Wassermannreaktion Verwendung finden sollte, festzustellen.

Zuvor aber galt es, zwei Fragen klarzustellen, die für die praktische Benutzung des Cholesterins zu dem genannten Zweck von ausschlaggebender Bedeutung sein mußten. Zunächst mußte entschieden werden, ob die Verdünnung 1:25, die in dem eben besprochenen Versuch die Eigenhemmung des Organextraktes genau zum Ausdruck zu bringen vermochte, in allen Fällen die richtige sei. Wie mir zahlreiche Versuche zeigten, läßt sich eine bestimmte Konzentration als allgemein gültige Regel nicht vorschreiben. Der Verdünnungsgrad, auf den die Cholesterinlösung zu bringen ist, hängt

einmal ab von der Beschaffenheit des Extraktes, den sie ersetzen soll, und zweitens von der Art, wie dieser Extrakt verdünnt worden ist. Durch die Untersuchungen von Sachs und Rondoni (25) ist festgestellt, daß die Art, in welcher die wirksamen Extraktstoffe in Lösung gebracht werden, überaus wichtig ist. Dasselbe Serum kann positiv oder negativ reagieren, je nachdem der Organextrakt fraktioniert oder rasch verdünnt worden ist. Auch die antikomplementäre Wirkung, die der Extrakt an und für sich ausübt, ist eine verschiedene; bei rascher Verdünnung ist sie nicht wahrzunehmen, während sie bei fraktionierter Verdünnung deutlich zum Ausdruck kommt.

Diese Angaben von Sachs und Rondoni, die ich bei meinen Untersuchungen vollkommen bestätigen konnte, sind auch bei der Verwendung der Cholesterinlösung sorgfältig zu berücksichtigen. Die von mir benutzten Extrakte, die ausnahmslos fraktioniert verdünnt wurden, zeigten alle keine oder nur eine geringe Eigenhemmung, wie aus Tabelle I zu entnehmen ist. Um eine ihnen gleichwertige indifferente Kontrollflüssigkeit zu erhalten, genügte es, die 0,1-proz. alkoholische Cholesterinlösung auf 1 : 25—1 : 30 zu verdünnen. Fast ausschließlich habe ich bei meinen Versuchen die Verdünnung 1 : 30 benutzt, welche die Eigenhemmung des cholesterinierten, ebenfalls auf 1 : 30 bezw. 1 : 25 verdünnten Luesherzextraktes I gerade zu ersetzen vermochte. Die Verdünnung der Cholesterinlösung erfolgte ebenfalls fraktioniert; es ergab sich dabei eine milchig-opaleszente Flüssigkeit, deren Trübung stärker oder schwächer war, je nachdem die Kochsalzlösung langsamer oder schneller hinzugefügt worden war. Im allgemeinen mußte die Zugabe der Kochsalzlösung langsam erfolgen, um eine geeignete Kontrollflüssigkeit zu erhalten. Bei stärker hemmenden Extrakten würde, wenn die fraktionierte Verdünnung nicht genügt, eventuell die Verwendung einer etwas stärkeren Cholesterinkonzentration angezeigt sein, bei schwächer hemmenden Extrakten eine schnellere Verdünnung oder die Benutzung höherer Cholesterinverdünnungen. In jedem Falle muß in einem Vorversuch, von dem weiter unten noch die Rede sein soll, festgestellt werden, ob die angewandte Cholesterinverdünnung und

der Organextrakt hinsichtlich ihrer Eigenhemmung als gleichwertig zu betrachten sind.

Die zweite Frage, welche für die praktische Verwendung der Cholesterinlösung als Kontrollflüssigkeit von Bedeutung sein mußte, war die, ob nicht unter Umständen positive, an Luesreaginen besonders reiche Sera imstande wären, im Verein mit einer auf 1 : 25—1 : 30 verdünnten Cholesterinlösung das Komplement in der für Syphilis charakteristischen Weise zu binden. Das ist nach meinen zahlreichen, an vielen hundert wassermannpositiven Serumproben ausgeführten Untersuchungen nicht der Fall. Ausnahmslos trat in den mit Serum und Cholesterinlösung angesetzten Röhrchen die Hämolyse innerhalb der üblichen Beobachtungszeit ein. Der Komplementbedarf war bei den verschiedenen Serumproben natürlich nicht immer der gleiche, wechselte aber im allgemeinen nur innerhalb recht eng gezogener Grenzen. Eine Gesetzmäßigkeit im Verhalten der positiven und negativen Sera ließ sich dabei nicht feststellen. Durchschnittlich lag vielleicht das Komplementminimum der positiven Sera etwas höher als das der negativen, doch konnten auch häufig positive Sera mit niedrigem und negative Sera mit hohem Komplementbedarf beobachtet werden. Ausgesprochen starke Eigenhemmung des Serums habe ich nur sehr selten feststellen können.

Auf Grund dieser Erfahrungen habe ich folgendes einfache Verfahren in Anwendung gebracht, um den Komplementbedarf jedes einzelnen Serums individuell zu bestimmen. Zunächst wurde der Ambozeptor in der üblichen Weise mit 0,5 ccm Komplement (1 : 10) austitriert; von der Titerdosis wurde das Vierfache für alle weiteren Untersuchungen benutzt. Dann wurde in einem Vorversuch die Brauchbarkeit der Cholesterinlösung bestimmt und das Komplement einerseits mit einem Gemisch von Normalserum + Cholesterinlösung, andererseits mit einem Gemisch von Normalserum + Extrakt ausgewertet. Gleichzeitig wurde das Komplement für sich allein und in Gegenwart des Normalserums austitriert. Sämtliche in dieser Weise angesetzten Proben kamen zunächst für $^1/_2$ Stunde ins Wasserbad, erhielten dann den üblichen Zusatz von Ambozeptor und Hammelblut und wurden dann nach weiterem

halbstündigen Aufenthalt im Wasserbad beurteilt. Tabelle IV veranschaulicht den Verlauf eines derartigen Vorversuches.

Tabelle IV.

Reihe	Gemisch	Komplement (1:10)					
		0,3	0,25	0,2	0,15	0,1	0,05
1	1 ccm NaCl	θ	θ	θ	θ	θ	+++
2	0,5 „ Normalserum 1 : 5 + 0,5 ccm NaCl	θ	θ	θ	θ	±	+++
3	0,5 „ „ 1 : 5 + 0,5 „ 0,1-proz. Cholest.-Lös. 1 : 30	θ	θ	θ	+	++	+++
4	0,5 „ „ 1 : 5 + 0,5 „ chol. Luesherzextr. I 1 : 30	θ	θ	θ	±	+	+++

Der Versuch zeigt, daß die Komplementtiterdosis in diesem Fall 0,1 ccm betrug (Reihe 1) und daß das Normalserum nur geringe Eigenhemmung aufwies (Reihe 2). Aus den Reihen 3 und 4 geht hervor, daß sowohl beim Gemisch Normalserum + Cholesterinlösung als auch beim Gemisch Normalserum + Extrakt 0,2 ccm Komplement zur völligen Lösung des hämolytischen Systems erforderlich waren. Beim Vergleich der Einzelergebnisse dieser Reihen wird ersichtlich, daß die durch die Cholesterinlösung bewirkte Hemmung etwas stärker ausgesprochen war als die durch den Organextrakt bedingte. Derartig minimale Unterschiede haben sich nicht störend bemerkbar gemacht. Ein geringes Ueberwiegen der Cholesterinhemmung habe ich im Gegenteil nicht ungern mit in Kauf genommen, weil ein minimaler Ueberschuß an Komplement mir als Sicherheitskoeffizient für die folgenden Versuche nur willkommen war. Vorsicht ist dagegen geboten, wenn die Cholesterinhemmung hinter der Extrakthemmung zurückbleibt. In diesem Falle läuft man Gefahr, für den Komlementbedarf der einzelnen Sera zu niedrige Werte und demzufolge im Hauptversuch bei allen Proben eine mehr oder weniger ausgesprochene Hemmung zu erhalten. Am sichersten ist es in solchen Fällen, den Versuch mit einer etwas langsamer verdünnten oder stärkeren Cholesterinlösung zu wiederholen. Selbstverständlich werden in jedem Falle, wie in der Tabelle nicht besonders vermerkt ist, die Brauchbarkeit des Hammelblutes und das Fehlen von Normalambozeptoren im Komplement in besonderen Kontrollen festgestellt.

Das für die Komplementauswertung benutzte Normalserum muß natürlich, wie auch aus Tabelle IV hervorgeht, möglichst geringe Eigenhemmung aufweisen. Der von R. Müller (10) sowie Stern und Danziger (13) gegen die Kaupsche Modifikation erhobene Einwand, daß die von Kaup angegebene Bestimmung des Komplementminimums nicht Anspruch auf absolute Genauigkeit machen könne, weil es kein Standardnormalserum gebe, trifft auch für das eben beschriebene Verfahren zu. Theoretisch ist es natürlich denkbar, daß das eine oder andere der zu untersuchenden Sera im Verein mit Extrakt bezw. Cholesterinlösung weniger Komplement bindet als das zum Vorversuch benutzte Normalserum. Praktisch wird aber dieser möglichen Fehlerquelle keine Bedeutung zukommen. Einmal liegt es in der Hand des Untersuchers, sich für die Komplementauswertung ein Normalserum mit möglichst geringer oder gar ohne Eigenhemmung auszuwählen (Reihe 2). Wenn aber andererseits doch einzelne Sera weniger Komplement verbrauchen, so stellt der dadurch bedingte geringe Komplementüberschuß im Hauptversuch nur eine erhöhte Sicherheit gegen das Auftreten etwaiger unspezifischer Hemmungen dar.

Nachdem das Komplementminimum für das Normalserum und die Uebereinstimmung der Cholesterinlösung mit dem Organextrakt in der oben beschriebenen Weise festgestellt worden sind, wird der Komplementbedarf der zu untersuchenden Sera in Gegenwart von Cholesterin in ähnlicher Weise bestimmt. Auf zwei Arten kann diese Untersuchung ausgeführt werden. Entweder werden von jedem Serum drei Kontrollröhrchen angesetzt, von denen das erste außer der Cholesterinlösung die im Vorversuch ermittelte Komplementminimaldosis, das zweite und dritte einen um 0,05 bzw. 0,1 ccm größeren Komplementzusatz erhält. In dem in Tabelle IV veranschaulichten Beispiel würden also dem ersten Gläschen 0,2 ccm, dem zweiten 0,25 ccm und dem dritten 0,3 ccm Komplement zugesetzt werden. Die Gemische Serum + Cholesterin + Komplement werden zunächst für $^1/_2$ Stunde ins Wasserbad gestellt, erhalten hierauf den üblichen Zusatz von Ambozeptor und Hammelblut und werden nach weiterem halbstündigen Aufenthalt bei 37° C beurteilt. In einem Teil der

Fälle ist alsdann schon im ersten Kontrollröhrchen mit 0,2 ccm Komplement völlige Hämolyse eingetreten, in einem weiteren Teil dagegen erst im zweiten und bei einigen, nach meinen Erfahrungen allerdings nur wenigen Proben vielleicht gar erst im dritten Röhrchen, das 0,3 ccm Komplement enthält. Die erhaltenen Werte stellen den minimalen Komplementbedarf für jedes Serum dar.

Einfacher und sparsamer, wenn auch etwas weniger exakt ist es, den Komplementbedarf in der Weise zu bestimmen, daß nur zwei Serumkontrollen angesetzt werden. Das erste Röhrchen erhält außer der Cholesterinlösung die im Vorversuch festgestellte Komplementminimaldosis, in unserem Beispiel also 0,2 ccm, das zweite eine um 0,1 ccm größere Komplementmenge, also 0,3 ccm. Ist nun nach Ablauf der Beobachtungszeit bei einigen Proben in den mit 0,2 ccm Komplement beschickten Gläschen die Hämolyse noch partiell gehemmt, während die zweiten Kontrollen gelöst sind, so erhalten erstere einen Zusatz von 1 Tropfen = 0,05 ccm Komplement und werden nochmals für etwa 15 Minuten ins Wasserbad gestellt. Da es sich meist nur um Hemmungen geringen oder geringsten Grades handelt, genügen oft schon wenige Minuten, bis eine totale Lösung des hämolytischen Systems zustande kommt; der Komplementbedarf beträgt demnach für solche Sera 0,25 ccm. Bleibt die Hämolyse aber aus, so muß die in der zweiten Kontrolle enthaltene Komplementmenge, die zur völligen Hämolyse ausgereicht hat, in unserem Beispiel also 0,3 ccm, als Minimaldosis für das betreffende Serum dienen. Es empfiehlt sich nicht, die zweite Beobachtungszeit über eine Viertelstunde hinaus auszudehnen, wiewohl ein nennenswertes Fortschreiten der Reaktion auch ohne den zweiten Komplementzusatz bei etwas längerer Einwirkung der Bruttemperatur nicht zu befürchten wäre. Zahlreiche Beobachtungen zeigten mir, daß geringe Hemmungen der Hämolyse, die nach halbstündigem Aufenthalt der Proben im Wasserbad festzustellen waren, sich nach einer weiteren 15 Minuten langen Bebrütung nicht augenfällig geändert hatten. Andererseits ist es aber auch nicht empfehlenswert, die Beobachtung nach dem zweiten Komplementzusatz zu lange auszudehnen, weil die ursprüngliche Reaktion, wie Kaup (6) festgestellt hat, nach den ersten

$^3/_4$ Stunden im Brutschrank doch noch etwas weitergeht, wenn auch nur mehr sehr langsam. Im Wasserbad verläuft die Reaktion bekanntlich in kürzerer Zeit. Für die Praxis sind bei diesem Vorgehen irgendwelche nennenswerten Störungen nicht zu befürchten. Ebensowenig hat in Bestätigung der Kaupschen Angabe, daß Komplement und Ambozeptor nur nach ihrer absoluten Menge, nicht nach der Stärke ihrer Konzentration wirken, die Vermehrung der Gesamtflüssigkeitsmenge um 0,05 ccm durch den zweiten Komplementzusatz zu Irrtümern Veranlassung gegeben.

Sind beide Kontrollen gelöst, so entspricht die im ersten Röhrchen enthaltene Komplementmenge der Minimaldosis. Hat ein Serum dagegen in beiden Kontrollen Eigenhemmung entfaltet, so muß natürlich das zweite Röhrchen noch einen Zusatz von 0,05 ccm Komplement erhalten und weiter im Wasserbad beobachtet werden. Tritt auch dann noch keine Hämolyse ein, so ist die Eigenhemmung mit höher ansteigenden Komplementmengen genau auszuwerten. Derartig stark ausgesprochene Eigenhemmungen habe ich nur in seltenen Ausnahmefällen beobachten können.

Das, wie im vorstehenden beschrieben, für jedes Serum einzeln festgestellte Komplementminimum stellt die Komplementmenge dar, die im Hauptversuch mit Serum und Extrakt zu mischen und dann in der üblichen Weise weiter zu behandeln ist. Soll die Reaktion rein qualitativ, etwa als Kontrolle oder zur Ergänzung der Originalmethode oder eines anderen Verfahrens, ausgeführt werden, so genügt es, ein Röhrchen mit dem jeweils festgestellten Komplementminimum anzusetzen. Wenn dagegen der Komplementverbrauch des Serums bei der spezifischen Bindung quantitativ gemessen werden soll, sind mehrere Röhrchen mit steigenden Komplementmengen, ähnlich wie bei der Kaupschen Modifikation, zu beschicken.

Ich habe das qualitative Verfahren in einer größeren Reihe von Paralleluntersuchungen einerseits mit der Originalmethode, andererseits mit der bisher am Institut üblichen Methode verglichen. Letztere unterscheidet sich von der Originalmethode lediglich dadurch, daß das Komplement mit der 4-fachen Ambozeptortiterdosis ausgewertet und im Haupt-

versuch das 2—2½-fache des gefundenen Titers benutzt wird, ähnlich wie bei dem von Sonntag (26) angegebenen Verfahren. Die bei diesem Vorgehen verwandte Komplementmenge betrug im Durchschnitt etwa 0,3 ccm, blieb also nicht unerheblich hinter der bei der Originalmethode vorgeschriebenen Dosis von 0,5 ccm zurück. Dementsprechend war auch die Empfindlichkeit des Verfahrens eine größere, wie Tabelle V zu entnehmen ist.

Tabelle V.

Originalmethode	Institutsverfahren					Zusammen
Ergebnisse	θ	±	+	++	+++	
θ	664	33	14	7	7	725
±	—	6	8	4	3	21
+	—	—	11	7	5	23
++	—	—	—	12	37	49
+++	—	—	1	—	192	193
Zusammen	664	39	34	30	244	**1011**

Ein Vergleich der beiden Methoden zeigt, daß unter 1011 untersuchten Fällen eine vollkommene Uebereinstimmung in quantitativer und qualitativer Hinsicht 885mal festzustellen war. Bei den übrigen 126 Proben zeigten die Resultate teils nur geringe quantitative Differenzen, teils aber auch ein völliges Auseinandergehen, das durch die geringere Empfindlichkeit der Originalmethode bedingt war. Werden die mit zweifelhaftem Ergebnis untersuchten Fälle den positiven zugerechnet, so ergibt sich, daß unter 1011 Fällen nach der Originalmethode 286 = 28 Proz. positiv und 725 = 72 Proz. negativ, nach dem Institutsverfahren dagegen 347 = 34 Proz. positiv und 664 = 66 Proz. negativ waren. Letzteres hatte also 61 = 6 Proz. mehr positive Reaktionen ergeben, die sich in der Hauptsache auf behandelte Luesfälle bezogen. Die Zahl der zweifelhaften (±) und schwach positiven (+) Ergebnisse betrug 73 gegenüber 44 gleichartigen Befunden der Originalmethode. Diese Differenz ist ohne weiteres verständlich, da es sich ja meist um behandelte Kranke, also Grenzfälle handelte, deren Serum nur noch einen geringen Gehalt an Luesreaginen aufwies.

Die Institutsmethode wurde mit dem von mir beschriebenen Verfahren an 2047 Serumproben verglichen. Selbstverständlich wurden bei allen diesen Untersuchungen, bei deren Ausführungen ich in dankenswerter Weise von Frl. Scheerer unterstützt wurde, immer die gleichen Reagentien benutzt, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen. Die Ergebnisse habe ich in Tabelle VI kurz zusammengefaßt.

Tabelle VI.

Institutsmethode	Cholesterinbindungsmethode					Zusammen
Ergebnisse	θ	±	+	++	+++	
θ	1336	44	34	8	1	1423
±	—	24	21	14	4	63
+	—	—	22	28	9	59
++	—	—	—	22	39	61
+++	—	—	—	—	441	441
Zusammen	1336	68	77	72	494	2047

Wie nicht anders zu erwarten war, erwies sich das mit der Komplementminimaldosis arbeitende Verfahren nicht unwesentlich empfindlicher als die den 2—2½-fachen Komplementtiter benutzende Institutsmethode. Eine völlige Uebereinstimmung in qualitativer und quantitativer Hinsicht ergab sich in 1845 Fällen. Von den übrigen 202 Proben reagierte ein Teil zwar qualitativ übereinstimmend, aber quantitativ verschieden. In 87 Fällen gingen die Befunde völlig auseinander, indem die Institutsmethode völlig negative, die Auswertung des minimalen Komplementbedarfs aber noch zweifelhafte oder positive Reaktionen ergeben hatte. Werden die zweifelhaften und positiven Reaktionen zusammengefaßt, so ergibt sich als Gesamtresultat, daß unter 2047 Fällen nach der Institutsmethode 624 = 30,4 Proz. positiv und 1423 = 69,6 Proz. negativ, bei der Anwendung des Komplementminimums dagegen 711 = 34,7 Proz. positiv und 1336 = 65,3 Proz. negativ reagiert hatten. Die Institutsmethode hatte gegenüber den in Tabelle V niedergelegten Erfahrungen einen etwas geringeren Prozentsatz positiver Resultate ergeben, offenbar bedingt durch die Art des eingesandten Materials. Die nur durch die Benutzung der minimalen Komplementdosis nach-

gewiesenen 87 positiven Reaktionen = 4,3 Proz. bezogen sich auch hier wieder zum großen Teil auf behandelte Luesfälle. Das Resultat konnte 32mal durch den positiven Ausfall der Ausflockungsreaktion nach Sachs-Georgi, bzw. 21mal durch die Meinicke-Reaktion (D.M.) bestätigt und gestützt werden. Die Anzahl der zweifelhaften Ergebnisse (±) war bei beiden Methoden ungefähr die gleiche geblieben, die Zahl der schwach positiven Reaktionen bei der Institutsmethode etwas niedriger.

Die in den Tabellen V und VI niedergelegten Beobachtungen machen es verständlich, daß die Vorteile des mit dem Komplementminimum arbeitenden Verfahrens noch deutlicher in Erscheinung treten, wenn zum Vergleich die Originalmethode herangezogen wird. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen, die an 826 Serumproben ausgeführt wurden, sind in Tabelle VII wiedergegeben.

Tabelle VII.

Originalmethode	Cholesterinbindungsmethode					Zusammen
Ergebnisse	θ	±	+	++	+++	
θ	501	29	33	9	13	585
±	—	4	1	8	6	19
+	—	—	4	11	8	23
++	—	—	—	2	45	47
+++	—	—	—	—	152	152
Zusammen	501	33	38	30	224	826

Wie Tabelle VII zu entnehmen ist, hatten beide Methoden unter 826 Fällen 663mal ein völlig übereinstimmendes Ergebnis in quantitativer und qualitativer Hinsicht geliefert. In 79 Fällen zeigten die Resultate nur quantitative Differenzen, 84mal gingen sie aber völlig auseinander. Faßt man die zweifelhaften und positiven Befunde gegenüber den negativen zusammen, so ergibt sich, daß nach der Originalmethode 241 Sera = 29,2 Proz. positiv und 585 = 70,8 Proz. negativ, bei Anwendung des Komplementminimums hingegen 325 = 39,3 Proz. positiv und 501 = 60,7 Proz. negativ reagiert hatten. Der durch das letztere Verfahren erzielte Ueberschuß von rund 10 Proz. positiver Reaktionen konnte in 35 Fällen durch den Ausfall

der Sachs-Georgi-Reaktion bestätigt werden. Von den 84 Fällen, die nur nach der Originalmethode negativ reagiert hatten, waren 45 behandelte Luesfälle; weitere 12 waren als Lues bezeichnet, 10 als Luesverdacht und 3 als Paralyse. Bei 6 Fällen war keine klinische Diagnose angegeben, bei den meisten von ihnen lag aber wohl ein mehr oder weniger begründeter Luesverdacht vor. Unter den übrigen Fällen konnte bei einem als Ulcus molle und einem als Gonorrhöe bezeichneten Fall eine luetische Erkrankung ebenfalls nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Von den letzten 6 Serumproben stammten 2 von Personen ohne klinische Erscheinungen, 2 von Erkrankungen, die als Nervenleiden bezeichnet waren, und die letzten 2 von Frauen, die eben ihre Entbindung überstanden hatten. Ob in diesen letzten 6 Fällen sich vielleicht doch noch Anhaltspunkte für eine syphilitische Infektion bei genauer Nachforschung ergeben hätten, war mir leider nicht möglich festzustellen. Zu betonen ist indes, daß sowohl bei den beiden Personen ohne klinische Erscheinungen als auch bei beiden Fällen von Nervenleiden die Hemmung der Hämolyse nur sehr schwach ausgeprägt (±) war, so daß die nochmalige Untersuchung empfohlen wurde. Bei den beiden anscheinend nicht syphilitischen Wöchnerinnen hingegen war das Resultat stark positiv (+++) und wurde bei der einen durch das positive Ergebnis der Institutsmethode, bei der anderen durch den positiven Ausfall der Ausflockungsreaktion nach Sachs-Georgi bestätigt und gestützt. Leider ließ sich in den zuletzt genannten 6 Fällen die nochmalige Untersuchung nicht ausführen.

Die praktische Verwendbarkeit einer Methodik, welche die Empfindlichkeit der Syphilisreaktion zu steigern sucht, steht und fällt mit dem Nachweis, daß die Aenderung der Originaltechnik nicht eine nennenswerte Häufung von unspezifischen Reaktionen zur Folge hat. Ich legte dieser Prüfung besondere Bedeutung bei und habe mich demgemäß von vornherein bestrebt, eine möglichst große Zahl von Sera gesunder Personen und andersartiger Erkrankungen in den Bereich meiner Untersuchungen zu ziehen. Unter letzteren seien besonders genannt Tuberkulose, Gonorrhöe, nichtluetische Hautkrankheiten, ferner Fälle von Ulcus molle, Ulcus cruris,

Furunkulose, Diabetes, Nephritis, Icterus, Ischias, Bronchitis u. a. Diese Kontrolluntersuchungen umfassen annähernd 200 Fälle, die, abgesehen von den im vorigen Abschnitt erwähnten Ausnahmen, eine vollkommene Uebereinstimmung der Originalmethode mit dem empfindlicheren Verfahren erkennen ließen. Nicht unerwähnt möchte ich lassen, daß ein Fall von Tuberkulose sowohl nach Wassermann als auch bei Anwendung des Komplementminimums zweifelhaft (±) reagierte. Die Wiederholung der Untersuchung nach 8 Tagen ergab nach beiden Methoden ein negatives Resultat. Es hatte sich also um eine vorübergehende unspezifische Hemmung geringsten Grades gehandelt, die aber um so weniger zu einer Fehldiagnose Veranlassung geben konnte, als keine klinischen Anhaltspunkte für eine syphilitische Erkrankung vorlagen.

Die Gefahr derartig zweifelhafter Reaktionen darf überhaupt, wie schon eingangs erörtert, nicht überschätzt werden. Der Kliniker wird eine solche serologische Diagnose nur dann im positiven Sinne verwerten, wenn es sich um sichere Luesfälle handelt. Ist der klinische Befund aber nicht eindeutig, so ist die Wiederholung der Untersuchung zu empfehlen, die dann oft die wünschenswerte Klarheit zu schaffen vermag. Unspezifische Reaktionen lassen sich mit absoluter Sicherheit bei keinem biologischen Verfahren vermeiden. Sie kommen gelegentlich auch bei der Originalmethode vor und spielen auch bei dem oben beschriebenen Verfahren keine nennenswerte Rolle. Zusammenfassend läßt sich demnach sagen, daß die Anwendung des minimalen, für jedes Serum individuell festgestellten Komplementbedarfs gegenüber der Originalmethode eine wesentlich größere Zahl von positiven Befunden liefert, die, abgesehen von seltenen Ausnahmen, streng spezifischer Natur sind.

Im vorstehenden glaube ich gezeigt zu haben, daß die Bestimmung des Komplementbedarfs für jedes Serum, das auf Syphilis untersucht werden soll, am genauesten und einwandfreiesten erfolgt, wenn das Komplement gegen das betreffende Serum in Gegenwart einer indifferenten Kontrollflüssigkeit ausgewertet wird. Als brauchbare Kontrollflüssigkeit, die lediglich die eigenhemmende Wirkung der Organextrakte

zum Ausdruck bringt, erwies sich bei meinen Untersuchungen eine 0,1-proz. alkoholische Cholesterinlösung in 25—30-facher Verdünnung. Bei Anwendung des mittels der Cholesterinlösung festgestellten Komplementminimums ergab sich gegenüber der Originalmethode eine Steigerung der positiven Befunde um 10 Proz. Diese Zahl beweist, daß das Verfahren der Kaupschen Modifikation mindestens gleichwertig sein muß. In der Tat ergab der direkte Vergleich beider Methoden eine fast vollkommene Uebereinstimmung bei der Untersuchung von 120 Serumproben. Nur bei einem behandelten Luespatienten, der nach dem von mir ausgearbeiteten Verfahren negativ reagierte, ließ sich nach Kaup eine minimale Hemmung der Hämolyse feststellen, auch das aber nur in dem ersten Röhrchen mit dem geringsten Komplementzusatz. Andererseits ergab die Cholesterinbindungsmethode bei einigen positiven Fällen einen quantitativ etwas stärkeren Ausschlag der Reaktion als die Kaupsche Modifikation. Diese Differenzen sind zu geringfügig, um daraus prinzipielle Unterschiede in der praktischen Leistungsfähigkeit beider Methoden abzuleiten.

Als Vorzüge meines Verfahrens gegenüber der Kaupschen Modifikation betrachte ich in theoretischer Hinsicht die Art der Einstellung des Komplementbedarfs für jedes Serum, in praktischer Hinsicht die allerdings nicht sonderlich ins Gewicht fallende Materialersparnis. Nach dem Kaupschen Verfahren müssen nämlich alle Sera mit 5 verschiedenen Komplementmengen angesetzt werden. Erst nach Abschluß der Untersuchung läßt sich aber entscheiden, ob alle diese Proben auch wirklich nötig waren. Es zeigt sich dann, daß bei manchen Serumproben mit stärkerer Eigenhemmung das erste oder die ersten Röhrchen für die Beurteilung nicht maßgebend, also entbehrlich sind, da auch die Kontrollen mit den entsprechenden Komplementmengen nicht völlig gelöst sind. Demgegenüber verwendet die Cholesterinbindungsmethode im Hauptversuch nur diejenige Komplementmenge, die, falls das Serum negativ ist, zur völligen Hämolyse ausreicht. Als Nachteil des letzteren Verfahrens muß dagegen bezeichnet werden, daß die Serumkontrollen und der Hauptversuch nur nacheinander angesetzt werden können und nicht

gleichzeitig, wie bei der Kaupschen Methode. Indes fällt dieser Zeitverlust nicht sonderlich ins Gewicht, zumal bei Benutzung des Wasserbades, das eine Verkürzung des Ablaufes der Reaktion ermöglicht. Der Wert der quantitativen Auswertung des Komplementverbrauches im Hauptversuch, deren Vorzüge Kaup meines Erachtens überzeugend dargetan hat, bleibt durch die vorstehenden Ausführungen und Untersuchungen unberührt.

Die höhere Empfindlichkeit der Cholesterinbindungsmethode läßt ihre Anwendung überall da empfehlenswert erscheinen, wo eine Verfeinerung und Ergänzung des Originalverfahrens erwünscht ist. Ein Ersatz der Originalmethode kommt nicht in Frage, seitdem diese für die Ausführung gewerbsmäßiger, öffentlicher und amtlicher Untersuchungen vorgeschrieben ist. Als Ergänzung und Kontrolle des ursprünglichen Verfahrens kann die Anwendung des geringsten Komplementbedarfs indes bei sachgemäßer Ausführung und kritischer Verwertung der Resultate gute Dienste leisten. Wahrscheinlich werden sich noch andere Stoffe finden, die sich ebensogut oder vielleicht noch besser zur Herstellung einer indifferenten Kontrollflüssigkeit eignen wie das Cholesterin. Letzteres hat den Vorzug, daß es sich durch Variation der Konzentration und Verdünnungsweise vollkommen der jeweiligen Eigenhemmung des Organextraktes anpassen läßt. Die Herstellung einer brauchbaren Cholesterinverdünnung erfordert allerdings eine gewisse Uebung, große Sorgfalt und Erfahrung, die zu erwerben indes nicht auf besondere Schwierigkeiten stoßen dürfte. Ersatzstoffe für das Cholesterin wären dann als geeigneter zu bezeichnen, wenn ihre Verdünnung auch ohne besondere Vorsichtsmaßregeln erfolgen könnte und wenn die Verdünnungsflüssigkeit durch eine weitgehende Konstanz der Wirkung ausgezeichnet wäre.

Zusammenfassung.

1) Die Kaupsche Modifikation der Wassermann-Reaktion zeichnet sich durch Zuverlässigkeit und gegenüber der Originalmethode durch größere Empfindlichkeit aus. Auch bei

Verwendung eines cholesterinierten Luesherzextraktes treten die Vorzüge des Verfahrens ohne Beeinträchtigung der Spezifität unverkennbar zutage.

2) Theoretisch bietet die Versuchsanordnung insofern zu Einwänden Anlaß, als die von Kaup aufgestellte Regel von der schützenden Wirkung des Normalserums auf Extrakte nicht in allen Fällen zu Recht besteht.

3) Zur einwandfreien Bestimmung des für jedes Serum erforderlichen Komplementminimums muß das Komplement mit dem Serum in Gegenwart einer indifferenten Kontrollflüssigkeit, welche lediglich die eigenhemmende, nicht aber die spezifisch bindende Wirkung des Extraktes zum Ausdruck bringt, ausgewertet werden.

4) Als geeignete indifferente Kontrollflüssigkeit hat sich eine 0,1-proz. alkoholische Cholesterinlösung in 25—30-facher Verdünnung erwiesen.

5) Eine derartige Cholesterinlösung ist ein brauchbares Mittel, um für jedes Serum individuell den minimalen Komplementbedarf zu ermitteln, der im Hauptversuch der Wassermann-Reaktion Verwendung finden soll.

6) Immer ist durch einen besonderen Vorversuch festzustellen, ob die angewandte Cholesterinverdünnung und der Organextrakt hinsichtlich ihrer Eigenhemmung als gleichwertig zu betrachten sind.

7) Gegenüber einem Verfahren, welches das $2-2^1/_2$-fache des einfachen Komplementtiters im Hauptversuch verwendet, ergab die Cholesterinbindungsmethode etwa 4 Proz. mehr positive Resultate.

8) Gegenüber der Wassermannschen Originalmethode lieferte die Cholesterinbindungsmethode 10 Proz. mehr positive Reaktionen, die, abgesehen von seltenen Ausnahmen, spezifischer Natur waren.

9) Die Kaupsche Modifikation und die Cholesterinbindungsmethode sind hinsichtlich ihrer praktischen Leistungsfähigkeit als gleichwertig zu betrachten.

10) Als Ergänzung und Kontrolle der Originalmethode kann das Cholesterinbindungsverfahren bei sachgemäßer Ausführung und kritischer Verwertung der Resultate zur Verfeinerung der Syphilisdiagnose wesentlich beitragen.

Literatur.

1) v. Wassermann, Berl. klin. Wochenschr., 1917, p. 105.
2) Lange, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 26, 1917, p. 396.
3) Browning und Mc Kenzie, ebenda, Bd. 2, 1909, p. 459.
4) Facchini, ebenda, Bd. 2, 1909, p. 257.
5) Graetz, Monatshefte f. prakt. Dermat., Bd. 53, 1911.
6) Kaup, Kritik der Methodik der Wassermannschen Reaktion und neue Vorschläge für die quantitative Messung der Komplementbindung. München, R. Oldenbourg, 1917.
7) Stern, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 5, 1910, p. 201, und Bd. 22, 1914, p. 117.
8) v. Wassermann und Lange, Serodiagnostik der Syphilis. Kolle-Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorganismen, 2. Aufl., 1913, Bd. 7, p. 951.
9) Zeißler, Berl. klin. Wochenschr., 1909, p. 1968.
10) R. Müller, Wiener klin. Wochenschr., 1917, p. 301.
11) v. Kaufmann, Med. Klinik, 1918, p. 607.
12) Sachs, Deutsche med. Wochenschr., 1920, p. 60.
13) Stern und Danziger, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 28, 1919, p. 377.
14) Keresztes, Wiener klin. Wochenschr., 1918, p. 272.
15) Hatziwassiliu, Deutsche med. Wochenschr., 1919, p. 600.
16) Ritz und Sachs, ebenda, 1912, p. 2009.
17) v. Wassermann und Citron, Zeitschr. f. exp. Path. u. Ther., Bd. 4, 1907, p. 273.
18) v. Wassermann, Berl. klin. Wochenschr., 1907, p. 1599.
19) Porges und Meier, Berl. klin. Wochenschr., 1908, p. 731.
20) Sachs und Altmann, ebenda, 1908, p. 494.
21) Sachs und Rondoni, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 1, 1909, p. 132.
22) Fleischmann, Berl. klin. Wochenschr., 1908, p. 490.
23) Desmoulière, Presse méd., 1913, No. 90.
24) Sachs, Berl. klin. Wochenschr., 1911, p. 2066.
25) Sachs und Rondoni, ebenda, 1908, p. 1968.
26) Sonntag, Die Wassermannsche Reaktion in ihrer serologischen Technik und klinischen Bedeutung. Berlin, Springer, 1917.

[Aus der Universitäts-Kinderklinik Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. v. Mettenheim)].

Ueber die Beziehungen der Darmbakterien zur Wasserstoffionenkonzentration.

Von Dr. **Kurt Scheer**,
Assistent der Klinik.

Mit 1 Kurve im Text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 22. Mai 1921.)

In dem biologischen Verhalten der verschiedenen Gruppen physiologischer und pathologischer Darmbakterien sowohl zueinander als auch zum Organismus des Wirtes spielt ihre teils vorhandene, teils fehlende Fähigkeit, selbst Säuren zu bilden, eine große Rolle; aber ebenso kommt auch ihrer Abhängigkeit von bestimmten Säuregraden des sie umgebenden Mediums, das ihnen eventuell als Nährboden dient, große Bedeutung zu.

Ueber diese Fragen sind schon zahlreiche Untersuchungen vorgenommen worden, bezüglich ihrer Methodik halten jedoch viele der Kritik physikochemischer Anschauungen nicht stand.

Vor allem sind die durch Titrationsmethoden bestimmten Aziditätsgrade schwer zu verwerten, seit es sich gezeigt hat, daß als ausschlaggebender Faktor in den biologischen Beziehungen der Bakterien zu den Säuren nur die Wasserstoffionenkonzentration [H˙] in Betracht kommt.

Auf die Unterschiede und die Ueberlegenheit der Messungen der [H˙] gegenüber der Bestimmung der Azidität durch Titrationsmethoden soll hier nicht eingegangen werden. Eingehendes ist darüber bei L. Michaelis [1]) zu finden.

Zur Lösung der oben angedeuteten Probleme ist es also erforderlich, die Bakterien in ihrem Verhalten zur [H˙] zu verfolgen, wobei die Messung der [H˙] entweder elektrometrisch

1) L. Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration. Berlin, Springer, 1914.

mittels der Gaskette, oder mit Hilfe von Indikatoren vorgenommen werden muß.

Von pädiatrischen Gesichtspunkten ausgehend, erschien es mir wichtig, diese Abhängigkeiten der einzelnen Bakteriengruppen von der [H˙] klarzustellen.

Im Zusammenhang mit den entsprechenden klinischen Befunden sind die Resultate dieser Untersuchungen in folgenden demnächst erscheinenden Veröffentlichungen bereits mitgeteilt: Heß und Scheer, Die Reaktion des Säuglingsstuhles und ihre Beziehung zu den Erregern der Ruhr. Arch. f. Kinderheilk., Bd. 69, 1921; und Scheer, Ueber die Ursachen der Azidität der Säuglingsfäzes. Zeitschr. f. Kinderheilk., Bd. 29, 1921, H. 5. Hier sind auch nähere Einzelheiten über die Untersuchungstechnik zu finden.

Ich bediente mich bei den Untersuchungen zur Bestimmung der [H˙] der elektrometrischen Messung mit Hilfe der Gaskette[1]) nach L. Michaelis[2]). Die folgende kurze Zusammenstellung der gefundenen Resultate mit den früheren Ergebnissen anderer Autoren auf diesem Gebiete bezweckt, einen Ueberblick über diese interessanten Beziehungen zu geben, und die große Bedeutung zu zeigen, welche die [H˙] für die einzelnen Bakteriengruppen sowohl untereinander als auch in ihrer physiologischen Wirkung für den Organismus, wie auch bezüglich ihrer Abhängigkeit von der Art des Nährbodens selbst hat.

Unter den säurebildenden Darmbakterien können wir zwei große Gruppen unterscheiden, die der gr. — Typhus-, Dysenterie-, Colibakterien und die gr. + Flora.

Von der ersten Gruppe vermögen nur die Colibakterien zu säuern. L. Michaelis und Marcora[3]) haben zuerst Untersuchungen über die dabei erreichte [H˙] angestellt. Sie fanden, daß Bact. coli eine zuckerhaltige Nährflüssigkeit in kurzer Zeit so weit anzusäuern vermag, bis eine [H˙] $= 1.10^{-5}$

1) Die Benutzung der Gaskettenapparatur wurde mir vom Leiter des Nahrungsmitteluntersuchungsamtes, Herrn Professor Tillmanns, gütigst gestattet, wofür ich auch hier ergebenst danke.

2) L. Michaelis l. c.

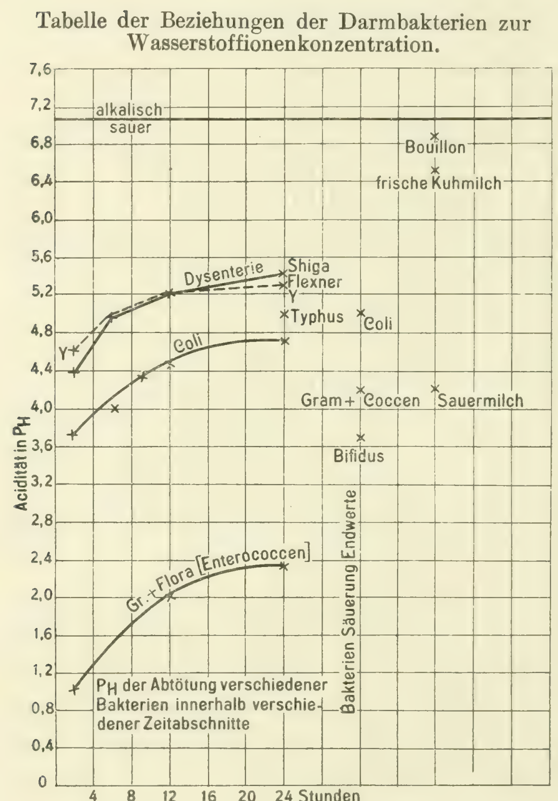
3) Michaelis und Marcora, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 14, 1912.

($p_H = 5$)[1]) erreicht ist. Dabei ist es gleichgültig, ob der ursprüngliche Zustand des Nährbodens mehr oder weniger alkalisch war; es wird immer eine $p_H = 5$, jedoch keine stärkere erreicht.

Dieser Befund wurde auch von Clark[2]) bestätigt.

Bei meinen Versuchen fand ich folgende Werte: 3 Proz. resp. 5 Proz. milchzuckerhaltige Bouillonproben (deren ursprüngliche $p_H = 6{,}79 - 6{,}89$ war) zeigten, mit verschiedenen Colistämmen beimpft, nach 2 bis 3 Tagen $p_H = 4{,}86$—$5{,}19$, also rund $p_H = 5$. Sie bestätigen also ebenfalls die von Michaelis und Marcora gefundenen Werte.

Tabelle der Beziehungen der Darmbakterien zur Wasserstoffionenkonzentration.



Diese wie auch die folgenden Befunde sind in beistehender Kurve übersichtlich zusammengestellt.

Die zweite Gruppe bildet die gr. + Flora. Unter dieser ist der Bacillus bifidus der stärkste Säurebildner. Beimpft man die verschiedensten Nährböden (zuckerhaltige Bouillon, Milch in den mannigfaltigsten Zubereitungsarten) mit bifidushaltigem Material, so

1) p_H ist der negative Logarithmus der Wasserstoffzahl.

2) Clark, Journ. of biolog. Chem., Vol. 21, 1915 (zitiert nach Centralbl. f. Bakt., Ref., 1917). Das Original war leider nicht zugänglich.

wird unter anderen Verhältnissen in 2 Tagen eine $p_H = 3,55$ bis 4,05, also rund eine $p_H = 3,77$ erreicht.

Weiterhin vermögen die Enterokokken und die meisten gr. pos. Darmbakterien, hauptsächlich die Gruppe der Buttersäurebazillen, bis zu einer $p_H = 4,2$ zu säuern.

Bis zu diesem Grade pflegt auch Milch (in frischem Zustande $p_H = 6,57$)[1]) sich selbst überlassen durch Wirkung der vulgären Säurebildner anzusäuern, so daß also auch Sauermilch einen Durchschnittswert von $p_H = 4,2$ hat.

Was nun die Säureresistenz der einzelnen Darmbakterien betrifft, so zeigte Bruenn[2]), daß die bakterizide Wirkung von Säuren, die in Form ihrer Alkalisalze gegenüber Bakterien indifferent sind, nur von der [H˙] abhängig ist. Er stellte seine Versuche mit Natriumlaktat- und Natriumazetatgemischen an, deren [H˙] rechnerisch ermittelt wurde, und prüfte damit Coli- und Typhusbazillen; dabei fand er, daß die bakterizide Wirkung nach 24 Stunden in einem gewissen Schwellenbereich liegt, der für Coli in runden Zahlen $[H^{\cdot}] = 2 \cdot 10^{-5}$ ($p_H = 4,7$) und für Typhusbazillen etwas weniger $[H^{\cdot}] = 0,25 \cdot 10^{-5}$ bis $1 \cdot 10^{-5}$ bis $2 \cdot 10^{-5}$ ($p_H = 5$) beträgt.

Diese Untersuchungen dehnte ich entsprechend auch auf andere Darmbakterien (Dysenterie und gr. + Flora) aus und bediente mich ebenfalls der Natriumazetatgemische, deren [H˙] sowohl rechnerisch bestimmt (siehe L. Michaelis, l. c. p. 17, 79) als auch außerdem in der Gaskette geprüft wurde. Für die gr. + Flora mußten HCl-Verdünnungen zu Hilfe genommen werden. Der Ablauf der Versuche wurde dem physiologischen Zustand angepaßt bei Brutschranktemperatur vorgenommen. Es zeigte sich, wie die Abtötung der verschiedenen Bakterien bei steigender [H˙] des Mediums in parallel verlaufenden Kurven (siehe Tafel) dargestellt werden kann. Die einzelnen Zahlen lauten:

Die Abtötung erfolgt für Coli

in 24 Stunden durch $p_H = 4,7$ (entspricht also dem Befunde Bruenns),
in 3 Stunden durch $p_H = 3,7$ (das ist der Säuregrad, den Bifidus als Säuerungsendwert erzielt).

1) Nach Davidsohn, Zeitschr. f. Kinderheilk., Bd. 9, 1913.
2) Bruenn, Inaug.-Diss. Berlin, 1913.

Für Dysenteriebazillen genügt zur Abtötung eine wesentlich schwächere [H˙], sie schwankt für die einzelnen Stämme (Shiga, Y, Flexner) nur in ganz geringem Maße. Danach werden abgetötet:

Dysenteriebazillen

in 24 Stunden durch $p_H = 5{,}4—5{,}3$,
in 3 Stunden durch $p_H = 4{,}6—4{,}3$.

Die durch die Säurebildung von Coli bewirkte $p_H = 5$ vermag also schon Dysenteriebazillen und eventuell auch Typhus abzutöten. Außerdem liegt der Säuerungsendwert der Coli dicht an der Grenze von $p_H = 4{,}7$, wo er selbst abgetötet wird. Es muß also ein Regulationsmechanismus vorliegen, wonach die Bakterien nur bis zu dem Säuregrad zu säuern vermögen, den sie eben noch ohne Schaden ertragen können.

Dagegen ist die gr. + Flora als sehr säureresistent zu betrachten. An Enterokokken vorgenommene Prüfung ergab folgende hohe Werte. Danach wurden abgetötet:

Enterokokken

in 24 Stunden durch $p_H = 2{,}36$,
in 12 Stunden durch $p_H = 2$,
in 3 Stunden durch $p_H = 1$.

Wir haben demnach im Darm mehrere Arten verschiedener säurebildender und säurefester Bakterien zu unterscheiden. Der Säureresistenz nach ergibt sich folgende Reihe:

in 24 Stunden wurden abgetötet:

Dysenteriebazillen	bei einer	$p_H = 5{,}4$,
Typhusbazillen	„ „	$p_H = 5{,}0$,
Colibazillen	„ „	$p_H = 4{,}7$,
gr. + Enterokokken	„ „	$p_H = 2{,}36$.

Der Säurebildung nach lautet die Skala: eine zuckerhaltige Flüssigkeit wird gesäuert bis zu folgendem Säuerungsendwert:

durch Coli bis $p_H = 5$ (kann also Dysenteriebazillen abtöten),
Enterokokken und die meisten gr. + Darmbakterien bis $p_H = 4{,}2$ (kann also Coli in 8 Stunden abtöten),
Bacillus bifidus bis $p_H = 3{,}7$ (kann also Coli in 3 Stunden abtöten).

Die Bedeutung dieser durch exakte Methoden gewonnenen, unter sich vergleichbaren Befunde ist nach vielen Richtungen groß. Es seien nur einige Beispiele erwähnt. Infolge der großen Säureempfindlichkeit der Dysenteriebazillen gegenüber

Coli, die ich auch in früheren Untersuchungen schon nachweisen konnte[1]), läßt sich der schwierige Nachweis von Dysenteriebazillen in älteren zur Untersuchung eingeschickten Stuhlproben dadurch erklären, daß die, von Jakoby[2]) wahrscheinlich gemachte, wachsende Azidität durch Bakterienwirkung herbeigeführt wird, wobei dann ein Grad erreicht wird, bei dem die Dysenteriebazillen abgetötet werden, so daß ihr Nachweis nicht mehr gelingt.

Andererseits lassen sich die physiologischen Eigentümlichkeiten, daß bestimmte Bakterien nur in bestimmten Abschnitten des Magendarmtraktus[3]) als ständige Bewohner auftreten, mit der [H˙] dieser Abschnitte in Einklang bringen. Während die Enterokokken überall auch im Magen bei hohen Aziditätsgraden und im normalerweise keimarmen Duodenum vorkommen, wird Coli nur vom mittleren Dünndarm abwärts als ständiger Bewohner gefunden. Er ist an die Grenze von $p_H = 4,7$ gebunden und kann nur da existieren, wo diese Grenze nicht nach der sauren Seite hin überschritten wird. Im Magen herrschen schwankende Aziditätsverhältnisse, je nach dem Zeitabstand von der Nahrungsaufnahme bis zu einer $p_H = 3,2$. Der sauere Mageninhalt wird im oberen Darm sukzessive abgestumpft, bis die Coliexistenzgrenze von $p_H = 4,7$ dauernd überschritten wird, von da ab tritt Coli als ständiger Bewohner auf. Wird aber infolge krankhaft vermehrter Sekretion alkalischen Darmsaftes die Neutralisierung des sauren Mageninhaltes schon frühzeitig im Duodenum erreicht, so ist auch hier schon ein geeigneter Nährboden für Coli geschaffen und es kommt zu der sogenannten endogenen Coliinfektion des Duodenums, ein Zustand, der in der Pathogenese der Säuglingskrankheiten eine große Rolle spielt. Weiterhin ist auch die Stuhlflora beim Säugling von der [H˙] der Fäzes abhängig.

Solche Beispiele ließen sich leicht vermehren; es würde jedoch der Rahmen der Arbeit dadurch überschritten. Hier sollte lediglich auf die interessanten Beziehungen hingewiesen werden zwischen den einzelnen Bakterienarten und der [H˙]; wie jeder Art eine bestimmte [H˙] bei der Säurebildung und

1) Scheer, Arch. f. Hyg., Bd. 88, 1919, H. 3.
2) Jakoby, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 90, 1920, H. 1.
3) Diese Darstellung bezieht sich auf die Verhältnisse beim Säugling

der Resistenz eigen ist, und wie sie dadurch wieder andere Arten beeinflussen resp. von ihnen beeinflußt werden kann.

Zusammenfassung.

Es wird auf die Beziehungen hingewiesen, die zwischen der Wasserstoffionenkonzentration des Nährbodens zu den Darmbakterien (Typhus-, Dysenterie-, Coligruppen und gr. + Flora) bestehen.

1) Die einzelnen Bakterienarten werden durch eine bestimmte, für sie charakteristische [H˙] in einer bestimmten Zeit abgetötet.

2) Die einzelnen Bakterienarten, welche die Fähigkeit haben, Säuren zu bilden, vermögen nur bis zu einer bestimmten, ebenfalls für sie charakteristischen [H˙] anzusäuren.

Die einzelnen Werte sind in erheblichem Maße sowohl bei der Abtötung als auch bei der Säurebildung voneinander verschieden, so daß sich hierin die Beeinflußbarkeit der einen Arten durch die anderen erkennen läßt.

[Aus der III. medizinischen Klinik der Universität Budapest (Direktor: Prof. Baron A. v. Korányi).]

Ueber die Wirkung der Metalle auf die Immunagglutination.

Von Dr. **K. Hajós.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 23. Mai 1921.)

Die Wiederaufnahme der oligodynamischen Untersuchungen durch Saxl hat diese Frage neuerlich wieder aufgerollt. Die Erklärung dieses Phänomens ist nicht einheitlich. Wir sehen, daß die früheren Autoren, wie Naegeli, Behring, Wolf, Spiro, die durch sie beschriebenen oligodynamischen Erscheinungen als eine chemische Wirkung aufgefaßt hatten, dagegen glaubt Saxl vorwiegend mit einer physikalischen Erscheinung zu tun zu haben und hat mit anderen neueren

Forschern in erster Linie die bakterizide Kraft der Metalle untersucht. Neuerlich stehen einander zwei Auffassungen zur Klärung dieser Wirkung gegenüber; nach der einen bekommen die verschiedenen Lösungsmittel, Gefäße usw. eine besondere Energie von den in ihnen aufgehobenen Metallstücken, wodurch sie dann ihre besondere Kraft ausüben; nach einer anderen Auffassung handelt es sich, wenn auch nur in Spuren, aber doch um die in Lösung gegangenen Metallteilchen, welche dann die sogenannte oligodynamische Wirkung ausüben.

Da es aber unter allen Umständen gelang, diese Metallteilchen in der Lösung, wenn auch nur in Spuren, nachzuweisen, könnten wir mit Recht nicht von einer oligodynamischen Wirkung, sondern von der Wirkung stark verdünnter Metalllösungen sprechen. So gelingt der Nachweis von Cu-Ionen mittels der Pagenstecherschen Reaktion in der Modifikation nach Spiro. Ueber den Nachweis des Silbers in Spuren berichtet neuerlich Acél in bezug zur bakteriziden Wirkung des Silbers. Von den übrigen Metallen spielt das Mg in folgender Mitteilung eine größere Rolle, dessen Nachweis auch in Spuren sehr leicht mit der mikrochemischen Reaktion in Form von $(NH_4)MgPO_4$-Kristallen geschieht. Auch andere Metalle können mit den bekannten mikrochemischen Methoden in ihren Lösungen nachgewiesen werden.

Die Metallösungen besitzen aber nicht nur bakterizide Fähigkeiten, sie beeinflussen andere Reaktionen auch. So waren es Arloing und Langerau, welche den Einfluß von kolloidalen Metallen auf das Komplement untersuchten. Heß und Reiter prüften die hämolytische Wirkung von Metallen. Baumgarten und Luger usw. beschrieben die Wirkung der Metalle auf die Fermentreaktionen und auf die Toxinwirkungen.

In der vorliegenden Arbeit werden die Untersuchungen mitgeteilt, welche sich mit der Wirkung von Metallösungen auf die Immunagglutination beschäftigen. Die Frage war, ob die Metalle überhaupt einen Einfluß auf die Agglutination besitzen, und wenn so ein Einfluß vorhanden ist, diese auch durch stark verdünnte Metallsalzlösungen erreicht werden kann.

Die Untersuchungen wurden zuerst mit B. paratyphi B und dessen Immunserum ausgeführt. Später zur Kontrolle,

ob die gefundene Wirkung auch bei anderen Immunagglutinationen besteht, wurden die Versuche teilweise mit B. paratyphi A und B. typhi abd. wiederholt, wobei die Befunde über die Paratyphus B-Agglutination bestätigt wurden.

Es wurde eine 24-stündige Schrägagarkultur mit destilliertem Wasser abgeschwemmt, die so erhaltene Emulsion in Reagenzröhrchen gefüllt und ein Stückchen des chemisch reinen Metalles hinzugesetzt, als Kontrolle wurde ein Reagenzglas Bakterienemulsion parallel aufgehoben. (Die Reagenzgläser waren vor dem Gebrauch sterilisiert, mit destilliertem Wasser durchgespült; so auch die Agglutinationsröhrchen.)

In der Tabelle I sind alle untersuchten Metalle zusammengestellt und zeigen den Einfluß auf Paratyphus B-Bazillen, agglutiniert mit einem Immunserum, Titer 1 : 10000. Die Agglutination wurde nach 2 Stunden langem Verweilen im Thermostat und nach 6 Stunden Zimmertemperatur abgelesen.

Tabelle I.

Metalle	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600
Tl	±	—	—	—	—	—	—	—
Mg	+	±	Sp	—	—	—	—	—
Zn	+	+	+	±	Sp	—	—	—
Al	+	+	+	±	Sp	—	—	—
Mn	+	+	+	±	±	—	—	—
Ni	+	+	+	+	±	Sp	—	—
Cr	+	+	+	+	±	Sp	—	—
Cd	+	+	+	+	+	±	—	—
Hg	+	+	+	+	±	±	—	—
Pb	+	+	+	+	+	±	—	—
Fe	+	+	+	+	+	±	—	—
Co	+	+	+	+	±	±	—	—
Pt	+	+	+	+	±	±	—	—
Sn	+	+	+	+	+	±	—	—
Cu	+	+	+	+	+	+	+	Sp
Ag	+	+	+	+	+	+	±	—
Kontrolle	+	+	+	+	+	+	±	—

Von der Metallbakterienemulsion wurden die Agglutinationsreihen nach 24, 48, 72 Stunden mit einem Paratyphus B-Immunserum (Titer 1 : 10000) aufgestellt. Es wurde konstatiert, daß kein Unterschied in der Agglutinabilität entsteht, gleichwohl ob die Metallbakterienemulsionen die genannte Zeit bei Zimmertemperatur, im Eisschrank oder im Brutofen standen.

Auch wurde festgestellt, daß nach 24 Stunden die Metallwirkung in der Bakterienemulsion schon maximal zum Vorschein kommt.

In einer anderen Versuchsreihe wurden die Metallstücke nicht zur Bakterienemulsion wie oben zugegeben, sondern zum Immunserum hinzugefügt, doch konnte kein Einfluß auf die Agglutination beobachtet werden. So wurde z. B. festgestellt, daß ein verdünntes Immunserum, welchem ein Stückchen Metall zugegeben wurde, zwar manchmal einen Niederschlag bildet, aber von der agglutinierenden Kraft nichts verliert.

Aus der Tabelle I ist ersichtlich, daß die Metalle die Agglutination etwas verschieden beeinflussen, und die meisten Metalle die Agglutination im Vergleich mit der Kontrolle hemmen.

Die Hemmung ist am auffallendsten bei Tl und Mg. Die weiteren Untersuchungen zur Klärung dieser Hemmung wurden nur mit Mg ausgeführt, da nur sehr geringe Mengen Tl zur Verfügung standen.

Bevor noch diese Untersuchungen besprochen werden, sollen kurz zusammengefaßt noch die übrigen Befunde betreffs der allgemeinen Metallwirkung mitgeteilt werden.

Die Temperatur beeinflußt die Metallwirkung nicht.

Das Licht hat keinen Einfluß auf die Metallwirkung. Dem Quarzlichte ausgesetzte Metallbakterienemulsionen ändern ihre Agglutinabilität gar nicht. (Bestrahlung der Bakterienemulsionen in Petrischalen durch 3 Stunden, 50 cm von der Quarzlampe entfernt.)

Die Kataphorese-Untersuchungen ergaben, daß die Metallbakterien ihre ursprüngliche anodische Wanderungsrichtung nicht ändern.

Die Tabelle II zeigt eine Zusammenstellung über die Agglutinabilität von Mg-Bakterien im Vergleich mit solchen, welchen statt Mg, Mg-Verbindungen zugesetzt wurden, und zwar zu 10 ccm Bakterienaufschwemmung 0,5 ccm kalt gesättigte MgO, $Mg(OH)_2$ oder 0,5 ccm 0,1-proz. $MgCl_2$-Lösung.

Aus dieser Tabelle sehen wir, daß das reine Mg bedeutend stärker die Agglutination hemmt, als die Mg-Verbindungen, wir können also annehmen, daß es sich hier um eine Metallwirkung handelt.

Tabelle II.

	abgelesen nach	$^1/_{100}$	$^1/_{200}$	$^1/_{400}$	$^1/_{800}$	$^1/_{1600}$	$^1/_{3200}$
Mg	2 Std.	Sp	Sp	—	—	—	—
	8 Std.	+	±	Sp	—	—	—
MgO	2 Std.	+	±	Sp	—	—	—
	8 Std.	+	+	±	Sp	—	—
$Mg(OH)_2$	2 Std.	+	±	Sp	Sp	—	—
	8 Std.	+	+	±	Sp	—	—
$MgCl_2$	2 Std.	+	+	+	±	Sp	—
	8 Std.	+	+	+	+	±	Sp
Kontrolle	2 Std.	+	+	±	Sp	Sp	—
	8 Std.	+	+	+	±	Sp	—

In einer weiteren Versuchsreihe wurden diese Agglutinationen mit Agglutininbakterien wiederholt.

Paratyphi B-Bazillen wurden gegen destilliertes Wasser bis NaCl-Freiheit dialysiert; die Immunserumverdünnungen wurden statt mit physiologischer NaCl-Lösung mit destilliertem Wasser angestellt.

Tabelle III zeigt den Einfluß von Mg und Mg-Verbindungen auf Agglutininbakterien. Zusatz von Mg und Mg-Verbindungen wie bei Tabelle II. Tabelle IV zeigt dieselbe Agglutinationsreihe. Nach Zusatz zu jedem Röhrchen von so viel NaCl, daß die gesamte NaCl-Konzentration einer $n/_{100}$-Lösung entsprach.

Tabelle III.

	$^1/_{100}$	$^1/_{200}$	$^1/_{400}$	$^1/_{800}$	$^1/_{1600}$	$^1/_{3200}$
Mg	—	—	—	—	—	—
MgO	±	—	—	—	—	—
$Mg(OH)_2$	Sp	Sp	—	—	—	—
$MgCl_2$	+	+	+	+	+	Sp
Kontrolle	—		—	—	—	—

Tabelle IV.

	$^1/_{100}$	$^1/_{200}$	$^1/_{400}$	$^1/_{800}$	$^1/_{1600}$	$^1/_{3200}$
Mg	Sp	—	—	—	—	—
MgO	±	+	+	±	—	—
$Mg(OH)_2$	+	+	±	Sp	—	—
$MgCl_2$	+	+	+	+	+	Sp
Kontrolle	+	+	+	+	+	Sp

Wir ersehen aus diesen Versuchen, daß die Mg-Agglutininbakterien bei der Agglutination nicht ausgesalzen werden können. Nun war die Frage näher zu untersuchen, ob die Mg-Bakterien vielleicht die Agglutinine gar nicht binden?

Der Castellanische Versuch mit Mg-Bakterien zeigt, daß die Agglutinine des Immunserums durch Mg-Bakterien vollständig gebunden werden, nur die Flockenbildung wird gehemmt, d. h. nur beträchtlich verzögert, da die Mg-Bakterien so, wie in den oben beschriebenen Untersuchungen, auch hier nach längerem Stehen, so nach 36—48 Stunden, ausgeflockt werden, allerdings auffallend schwächer als in den Kontrollröhrchen.

Die Alkalität der Mg-Bakterienemulsion hat keinen Einfluß auf die Agglutination, da sie sehr gering ist.

Zusammenfassung.

Die Metalle beeinflussen gewissermaßen auch die Immunagglutination. Am stärksten hemmt die Agglutination das Tl, Mg, weniger Zn, Al, Mn, die übrigen Metalle haben kaum einen nennenswerten Einfluß.

Die hemmende Wirkung des Mg ist nur eine zeitliche und bezieht sich nur auf die zweite Phase der Agglutination, nach längerem Stehenbleiben des Agglutinationssystems wird die Ausflockung sichtbar.

Die Spuren von Metallen konnten in den Metallbakterienaufschwemmungen mit mikrochemischen Reaktionen nachgewiesen werden.

Literatur.

Saxl, Wiener klin. Wochenschr., 1917, No. 23, 29, 31, 45; 1919, No. 40; Med. Klinik, 1917, No. 28, 46.

Spiro, Münch. med. Wochenschr., 1915, p. 1601; Biochem. Zeitschr. Bd. 74.

Naegeli, Behring, Wolf zit. nach Spiro, n. Gotschlich, Kolle-Wassermann, Bd. 3, 2. Aufl.

Arloing-Langerau ref. Kongr., Centralbl. f. innere Med. Bd. 15, H. 7.

Heß und Reiter, Med. Klinik, 1920, p. 976.

Baumgarten und Luger, Wiener klin. Wochenschr., 1917, No. 39—40.

Acél, Biochem. Zeitschr. Bd. 112.

[Aus dem Hygiene-Institut der Universität Greifswald.]

Ueber die Wirkung der Einspritzung von Serum, Toxinen und anderen Giften in die Carotis zentralwärts bei verschiedenen Tierarten.

Von Professor Dr. **E. Friedberger** und Dr. **K. Oshikawa.**

Mit 2 Abbildungen im Text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 25. Mai 1921.)

Inhaltsverzeichnis.

I. Einleitung.

Die Versuche, über die im Nachstehenden berichtet werden soll, wurden durch eine interessante Arbeit von J. Forssman

„Ein neues Krankheitsbild nach Seruminjektion“ [1]) veranlaßt. Sie beziehen sich auf eine eigentümliche Wirkung hammelhämolytischer Antisera beim Meerschweinchen nach Injektion in die Carotis gegen das Herz zu, ein Injektionsmodus, den wir im Nachstehenden kurz als zentral-karotal bezeichnen wollen.

Die Einwirkung derartiger Antisera auf den Meerschweinchenorganismus ist zuerst von Friedberger [2]) sowie Friedberger und Castelli [3]) bereits vor 11 Jahren festgestellt worden. Friedberger fand nicht nur die auch später von Weil bestätigte Anaphylaxie-auslösende Wirkung der Antieiweißsera. sondern er entdeckte bei dieser Gelegenheit auch ihre eminente Giftigkeit für das Meerschweinchen und führte sie auf den gleichzeitigen Gehalt solcher Sera an Antigenresten und Antikörpern zurück.

Gegen eine übergreifende Reaktion von dem auf das Hammeleiweiß eingestellten Kaninchenserum auf das des Meerschweinchens im Sinne einer phylogenetischen Verwandtschaftsreaktion, als Ursache der Giftigkeit, sprachen eine Reihe von Argumenten, vor allem: 1) das Fehlen entsprechender Verwandtschaftsreaktionen im Vitroversuch, 2) die Unabhängigkeit der Giftigkeit vom Titer des Serums. 3) die Tatsache, daß auch z. B. Antityphus und Antihefesera giftig wirkten, bei denen doch eine Verwandtschaftsreaktion mit Meerschweinchen ausgeschlossen war.

Friedberger und Castelli zeigten, daß die Giftigkeit innerhalb weiter Grenzen dem Antikörpergehalt der Sera nicht parallel geht und schlossen aus dem Charakter der Toxizitätskurve, in der unabhängig vom absoluten Antikörpergehalt die Toxizität deutliche Beziehungen zur Antigenzufuhr zeigte, auf die Bedeutung des Antigenrestes. Daß aber daneben der Antikörper eine conditio qua non für die Giftwirkung darstellt, ergab sich nach diesen Autoren aus der Tatsache, daß Ausfällung des Antikörpers mit dem homologen Antigen dem Serum mit dem Antikörper zugleich die Giftigkeit raubt.

Damals schrieben sie noch im 13. Schlußsatz ihrer Arbeit: „Es ist ausgeschlossen, daß ein Uebergreifen der Reaktion vom Antihammelkörper oder Antityphuskörper des Kaninchens auf das Meerschweincheneiweiß für die toxische Wirkung unserer Sera verantwortlich zu machen ist.“

Das wurde schon vorher von Friedberger daraus gefolgert, daß ein Uebergreifen der Reaktion auf das Eiweiß einer vom Hammel so entfernten Tierspezies wie das Meerschweinchen ausgeschlossen sei, zumal auch ganz schwach präzipitierende Sera anaphylaxie-auslösend wirkten.

Durch die grundlegenden Entdeckungen Forssmans

---

[1]) Forsman, Biochem Zeitschr., Bd. 110, 1920, S. 164.

2) Friedberger, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 3, Orig., 1909, Heft 7, p. 692.

3) Friedberger und Castelli, ebenda. Bd. 6, 1910, Heft 1, p. 179.

mußten diese Schlußfolgerungen einige Jahre später zunächst eine wesentliche Einschränkung erfahren.

Forssman hat bekanntlich gezeigt, daß ein Hammelhämolysin nicht nur durch die Einspritzung des homologen Antigens, Hammelblut, sondern auch durch Meerschweinchenorgane regelmäßig bei Kaninchen erzeugt wird. Man bezeichnet derartige Antikörper, die insofern noch spezifischer sind als die homologen, als sie im Gegensatz zu jenen z. B. nicht auf Rinderblut übergreifen, allgemein als heterogenetische Antikörper [Friedberger-Schiff[1])]. Im Verlauf der weiteren Untersuchungen, an denen sich neben Forssman vor allen Dingen Hintze, Orudschiew, Amako, Doerr und Pick, Friedberger, Bail und Margulies Sachs und Nathan, Friedberger und Schiff, Schiff, Weil, Doerr und Pick, Rothacker, Forssman und Fex, Morgenroth und Bieling, Tsuneoka, Fukuhara und Ando, Amako, Friedberger und Goretti, U. Friedemann, Friedberger und Collier, Friedberger und Suto[2]), Sordell und Fischer[3]), Georgi[4]), Seligmann und Gutfeld[5]), Donati[6]), Sachs und Guth[7]), Schiff[8]) Friedberger und Jarre[9]), Gaethyens[10]), Landsteiner[11]) beteiligten, wurde unter anderem festgestellt, daß dieses heterogenetische Hammelhämolysin in der Natur weit verbreitet ist. Es findet sich u. a. in den Organen von Meerschweinchen, Huhn, Katze, Hund, Pferd und Schildkröte. Es fehlt in den Organen von Kaninchen, Aal, Frosch, Gans, Hammel, Mensch, Ratte, Rind, Schwein und Taube. Demgemäß sprechen wir mit Bail ganz allgemein von einem „Meerschweinchen-“ und „Kaninchentypus“.

---

1) Friedberger und Schiff, Berl. klin. Wochenschr., 1913, No. 34, p. 50.

2) Literatur bis 1919 siehe bei Friedberger und Suto, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 28, 1919, p. 217.

3) Sordelli und Fischer, Revista del. Inst. Bacteriol. Buenos-Aires, 1918, S. 229.

4) Georgi, Arb. a. d. Speyerhause, 1919, H. 9.

5) Seligmann und Gutfeld, Berliner klin. Wochenschr., 1919, No. 41, S. 964.

6) Donati, Boletin da Sociedade de Medicina e Chirurgia de S. Paulo, Novembro 1919, No. 9.

7) Sachs und Guth, Med. Klinik, 1920, No. 6.

8) Schiff, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 29, 1920, p. 543.

9) Friedberger und Jarre, Zeitschr. f. Immunitätsf., 1920, Bd. 30. p. 351.

10) Gaethyens, Med. Klinik, 1920, No. 21. — Diese Zeitschr.,

11) Landsteiner, Verslagen der Afdeeling Naturkunde, Königl. Akad. d. Wiss. Amsterdam, 1921, Tl. 29, No. 8, S. 1118—1121.

Die ersten von Forssman selbst entdeckten heterogenetischen Antikörper waren nun die durch Meerschweinchenorgane erzeugten. Es bilden aber nicht nur Meerschweinchenzellen Antikörper für Hammelblut, sondern sie binden sie auch sowohl in vitro als auch namentlich nach den Versuchen von Doerr und Pick in vivo.

Es lag also nahe, die Giftigkeit der Antihammel-Kaninchensera für das Meerschweinchen auf Grund dieser Versuche zu erklären.

Wenn ein isogenetischer Antihammel-Kaninchenantikörper in den Organismus eines Meerschweinchens injiziert wird, so bindet sich der Ambozeptoranteil, der zum Meerschweincheneiweiß Affinität hat, mit den entsprechenden Komplexen im Meerschweinchenorganismus, und unter Komplementzutritt erfolgt die Giftbildung in vivo, ähnlich wie wir uns die Giftwirkung in der bekannten Versuchsanordnung von Belfanti und Carbone zu denken haben. Diese Erklärung wurde auch von Forssman und Hintze[1]) alsbald herangezogen und unabhängig von ihnen von Orudschiew und Sachs, sowie Doerr.

Die zweite Quote des isogenetischen Antiserums, die auch auf Rinderblutkörperchen eingestellt ist und durch Meerschweinchenorgane nicht gebunden wird, ist dementsprechend für die Toxizität der Sera beim Meerschweinchen indifferent.

Nun schien es auch erklärt, weshalb die Giftigkeit der Sera unabhängig von ihrem in vitro ermittelten Antikörpergehalt war oder ihm wenigstens nicht immer parallel ging (Friedberger und Castelli).

Es hing das von dem Gehalt der Antisera an den beiden Quoten des Antikörpers ab, der von Fall zu Fall natürlich verschieden sein konnte.

Ueberwog der Meerschweinchenanteil, so konnte das Antiserum auch bei absolut niederem Titer für Hammelblut giftiger sein; überwog die Rinderblutquote, so konnte es trotz vielleicht höheren hämolytischen Titers ungiftiger sein. Die Annahme der hypothetischen Antigenreste zur Erklärung des mangelnden

1) Forssman und Hintze, Biochem. Zeitschr., Bd. 44, 1912.

Parallelismus zwischen Antikörpergehalt und Toxizität im Sinne von Friedberger und Castelli schien überflüssig.

Bei den gleichfalls für das Meerschweinchen toxischen heterogenetischen Antikörpern mußte aber der Parallelismus zwischen Antikörpergehalt und Giftigkeit mehr hervortreten, weil ja hier wesentlich jene eine Antikörperquote vorhanden war, die von den Meerschweinchenorganen gebunden wird.

Tatsächlich beobachteten denn auch Sachs und Nathan bei Seris, die mit gekochten Hammelerythrozyten hergestellt waren (und die dem Typus der heterogenetischen Sera entsprechen), einen Parallelismus der Giftigkeit mit dem hämolytischen Titer.

Friedberger und Goretti fanden aber, daß auch im heterogenetischen Antiserum ebensowenig wie im isogenetischen Serum die Giftigkeit für das Meerschweinchen etwa dem Antikörpergehalt parallel geht.

Nicht einmal bei einem und demselben heterogenetischen Antiserum war es im Verlauf der Immunisierung der Fall, wie es für das isogenetische Serum gleichfalls schon Friedberger und Castelli nachgewiesen haben.

Weiterhin werden zwar nach Friedberger und Goretti das giftige Prinzip der Antisera und der hämolytische Ambozeptor gleichzeitig gebunden. Es besteht aber kein quantitativer Parallelismus. Auch bei Bindungsversuchen in vivo beim Meerschweinchen konnten die Autoren keinen Zusammenhang zwischen Giftigkeit und Intensität der Ambozeptorwirkung feststellen.

Bei Erwärmung inaktiver isogenetischer und heterogenetischer Sera auf 65° erleidet zunächst der Ambozeptor eine stärkere Abnahme als die Giftigkeit.

Das alles spricht schon gegen die Ansicht von Forssman, Sachs, Doerr, daß das giftige Prinzip mit dem Ambozeptor allein identisch ist.

Vor allen Dingen aber konnten Friedberger und Goretti folgendes zeigen:

Bei der Dialyse und Ausfällung mit Kohlensäure geht, wie wir wissen, der Ambozeptor im wesentlichen in den Niederschlag (Globulinfraktion). Trotzdem erweisen sich die Globuline als ungiftig, während die Albuminfraktion die Toxizität unverändert oder fast unverändert bewahrt. Diese Tatsache widerspricht der Theorie von Forssman über die Ursache der Giftigkeit der Antisera, sie ist aber mit der Theorie von Friedberger und Castelli wohl vereinbar.

Die Ursache der rätselhaften Giftigkeit ist also noch keineswegs klargestellt.

Nun hat uns Forssman, wie schon erwähnt, mit einer neuen höchst interessanten Wirkung dieser Antieiweißsera bekannt gemacht.

Werden sie nicht wie gewöhnlich intravenös, sondern in die Carotis nach dem Herzen zu, „karotal-zentral" eingespritzt, so entsteht nicht das gewöhnliche Bild der anaphylaktischen Vergiftung, wie sie Friedberger und Castelli als „primäre Antiserum-Giftigkeit" und Forssman als „umgekehrte Anaphylaxie" deswegen bezeichnet hatte, weil umgekehrt wie beim gewöhnlichen anaphylaktischen Versuch dem Tier nicht das Antigen, sondern der Antikörper zugeführt wird, und das Antigen im Sinne von Forssman in seinem eigenen Körpergewebe enthalten ist.

Die Symptome, wie sie nach karotal-zentraler Einspritzung solcher Sera auftreten, bestehen in Gleichgewichtsstörungen (Manège- und Rollbewegungen, auch Drehungen um die Längsachse und Störungen der Augenbewegungen), Symptome, die von Forssman zu Unrecht auf eine Affektion des Kleinhirns zurückgeführt werden (s. p. 102).

Die Tiere sterben in der Regel nicht so akut wie bei der Anaphylaxie, sondern häufig erst innerhalb einiger Stunden, selbst erst in 1—2 Tagen, wobei sie schon in dieser kurzen Zeit die schwerste Abmagerung zeigen. Häufig, namentlich bei größeren Dosen, tritt eine vollkommene Parese ein.

Diese, von der seither bekannten Wirkung der primärgiftigen Antisera, d. h. vom anaphylaktischen Symptomenkomplex, so absolut abweichenden Erscheinungen sind nach Forssman bei der zentral-karotalen Einspritzung durch die besonderen Gefäßverhältnisse des Meerschweinchens bedingt. Das toxische Serum soll „in einer Konzentration wie sonst nie dem Kleinhirn und den dort befindlichen Zellgruppen zugeführt werden, durch deren Reaktion mit dem Serum der Symptomenkomplex dann ausgelöst wird". Vielleicht handelt es sich dabei nach ihm auch um eine Aktivierung durch das Blut. Als Ursache nimmt er eine für die betreffenden hammelhämolytischen Sera spezifische Substanz an, die nach seiner Meinung als „verschieden von der intravenös tödlichen Substanz und als eine neue Immunsubstanz aufzufassen ist".

Wir können die Angaben Forssmans bezüglich der karotal-zentralen Wirkung bestätigen und ebenso die Tatsache,

daß solche Sera hier schon in bedeutend kleineren Dosen wirksam sind als von der Vene aus.

Technik: Zur Technik unserer Versuche bemerken wir kurz folgendes:

Das Tier wird auf dem Friedbergerschen Brett[1]) aufgespannt. Hautschnitt vom Kinn bis zur Symphyse. Freilegung der Gefäße unter Schonung des Vagus. Die Einspritzungen geschehen, sofern das Serumvolumen in vereinzelten Versuchen an sich nicht etwas größer war, stets in einem Volumen von 0,5 ccm (Auffüllung mit physiologischer Kochsalzlösung). Die Injektionszeit betrug jedesmal, sofern nichts Besonderes vermerkt, 5—7 Sekunden, mit der Stoppuhr gemessen. Die injizierte Flüssigkeit war bei Zimmertemperatur (20°) gehalten.

Die Einspritzungen in die Vene, wie in die Carotis geschahen in das freigelegte Gefäß nach peripherer Unterbindung, soweit nichts anderes angegeben, nach dem Herzen zu.

Die Tiere wurden dann sofort abgespannt, ohne daß die beträchtliche Halswunde, die vom Kinn bis in die Gegend des Manubrium sterni reichte, geschlossen wurde. Dadurch wurde jeder Druck vermieden. Vor allen Dingen aber heilten die Wunden so ohne jegliche Asepsis stets per primam, während wir früher bei genähten Tieren sehr häufig Tod durch Eiterung hatten.

Wir lassen nun unsere Versuche folgen.

II. Die Giftwirkung verschiedener Antihammel-Kaninchensera beim Meerschweinchen von der Carotis aus.

Wir bringen zunächst die Auswertung mit einem Kaninchen-Antihammelserum:

Kaninchen No. 59, grau, erhält am 3., 15., 22. und 27. XI. je 1 ccm gewaschenes Hammelvollblut intravenös. Am 1. XII. wird das Tier, das die letzte Injektion schlecht vertragen hatte und abgemagert war, entblutet. Hämolytischer Titer für Hammelblut 0,0004 komplett.

Auswertung der primären Antiserumwirkung von der Vene aus:

Meerschweinchen No. 5, 330 g, erhält am 2. XII. 20 0,7 Serum vom Kaninchen 59 in die rechte Jugularis. Etwas beschleunigte Atmung und Kaubewegungen, Tier bleibt sonst völlig normal.

Meerschweinchen No. 3, 270 g, erhält 0,05 des gleichen Serums in 0,5 Volum in die rechte Carotis zentral. Nach einer Minute Fell gesträubt, Tier schnuppert etwas, bleibt aber sonst normal.

Meerschweinchen No. 4, 275 g, erhält 0,1 des gleichen Serums in 0,5 Volum

1) Diese Zeitschr., Bd. 11, 1911, S. 389.

karotal-zentral. Sofort nach der Injektion Manègebewegung gegen den Uhrzeiger. Linkes Auge nach unten gegen Nasenspitze, rechtes Auge nach oben gegen Schädeldach gerichtet. Tier legt sich auf linke Seite, rechtes Vorderbein vor linkem, linkes Hinterbein vor rechtem. Tier richtet sich bald wieder auf und sitzt dann in vollkommenem Bogen nach links (Konvexität nach rechts). Geradegesetzt, klappt es sofort wieder wie ein Taschenmesser nach links um. Immer erneute Manègebewegungen, Cornealreflex erhalten. Nach 3 Minuten erneute Manègebewegungen. Tier dreht sich mit der Vorderhand um die Hinterhand als Fixpunkt. Auf die rechte Seite gelegt, fällt es wieder zurück, auf die linke Seite gelegt, bleibt es liegen. Auf Rücken gelegt, zeigt es genau die gleiche Konvexität wie auf dem Bauch. Kotabgang. Nach $6^1/_2$ Minuten Cornealreflexe im Erlöschen, Sensibilität erhalten (Kneifen am Ohr). Hält man den Kopf nach links, bleibt der Körper ruhig, dreht man dagegen den Kopf nach rechts, wird das Tier sofort unruhig, dabei starker Widerstand des Kopfes. Links Halsmuskulatur vollkommen weich. Rechts starker Tonus. Schiebt man den Kopf eine Zeitlang nach rechts, so läßt der Tonus nach. Nach $^1/_2$ Minute losgelassen, fliegt aber der Kopf sofort wieder nach links. Unter wiederholten Manègebewegungen erfolgt nach 7 Stunden der Tod.

Sektionsbefund: Bauchorgane intakt, Lunge hyperämisch, leicht gebläht. Gehirn ohne makroskopischen Befund.

Meerschweinchen No. 8, 215 g, erhält am 6. XII. 20 0,3 des gleichen Serums in die rechte Carotis in zentral 8 Sekunden. Tier legt sich sofort auf die Seite, Abgang von Urin und Kot, kein Strabismus, Atmung verlangsamt, Tier zeigt keine Abneigung gegen das Lagern auf der rechten Seite. Doch zeigt es im Sitzen wiederum Drehung des Kopfes nach links und ausgesprochene Rechtskonvexität. Nach 3 Minuten Krämpfe, die etwas an Anaphylaxie erinnern, rechtes Auge nach dem Schädeldach gerichtet, linkes Auge etwas nach der Nasenspitze. Nach 7 Minuten tot. Lungenblähung, Hyperämie, Oedem, geringe Gehirninjektion.

Meerschweinchen No. 1, 250 g, erhält am 2. XII. 0,5 Serum No. 59 wie voriges Tier in 7 Sekunden in die rechte Carotis. Sofort Krämpfe, dann Rollbewegungen von rechts nach links, starker Strabismus linkes Auge, Schädeldach, rechtes Nasenspitze, Atmung tief und langsam. Nach 7 Minuten Rollbewegungen, Cornealreflex erloschen, Strabismus vorüber. Trotz starker Inspiration nur mäßige Einziehung des Thorax; tot nach 40 Minuten unter Austritt schaumiger Flüssigkeit aus der Nase. Obduktionsbefund: Lunge hyperämisch, Herz schlägt noch, bei Anschneiden der Lunge zeigt sich starkes Oedem.

Normales Kaninchenserum ist in entsprechenden Dosen sowohl von der Carotis wie von der Vene aus gänzlich unwirksam.

Meerschweinchen No. 6, 215 g, erhält am 5. XII. 0,5 Normalkaninchenserum karotal-zentral rechts, keine Symptome.

Meerschweinchen No. 7, 215 g, erhält am 5. XII. die gleiche Dosis des Serums in die rechte Jugularis, keine Symptome.

Es ergibt sich also aus dieser Versuchsreihe, daß ein hämolytisches Antihammelblut-Kaninchenserum vom Titer 0,0004 in der Dosis von 0,1 karotal-zentral unter einem typischen Symptomenbild tötete, während dasselbe Serum von der Vene aus in mindestens 7-fach höherer Dosis indifferent war, und auch normales Kaninchenserum in entsprechenden Dosen nicht tötete.

Tabelle I.

Bestimmung der tödlichen Dosis des Antihammelblutserums No. 59 von Carotis und Vene aus.

Datum	Meer-schw. No.	Gewicht in g	Ort der Injekt.	Serum	Menge des Serums	Tod nach	Symptome
2. XII. 20	5	330	r. V.	No. 59	0,7	—	Etwas beschl. Atmung; sonst normal
2. XII. 20	3	270	r. C.	dgl.	0,05	—	Keine Symptome
2. XII. 20	4	275	r. C.	„	0,1	7^h	Typische Symptome
6. XII. 20	8	215	r. C.	„	0,3	7′	Linksstellung, Strabismus, Krämpfe
2. XII. 20	1	250	r. C.	„	0,5	40′	Typische Sympt., Rollbewegung
Kontroll.							
5. XII. 20	6	215	r. C.	Normal-Kan.-Ser.	0,5	—	Keine Symptome
5. XII. 20	7	215	r. V.	dgl.	0,5	—	„ „

Weitere Versuche wurden mit einem Antihammelblut-Kaninchenserum Sch. angestellt, das genau den gleichen Titer hatte. Vorbehandlung des Kaninchens mit Hammelblutkörperchen etwa nach demselben Schema wie das vorige. Titer 0,0004. Bestimmung der tödlichen Dosis karotal-zentral und von der Vena jugularis aus:

Meerschweinchen No. 73, 250 g, erhält am 19. II. 0,3 Serum Sch. in die rechte Jugularis. Schwere Anaphylaxieerscheinungen; tot in 1 Stunde.

Meerschweinchen No. 190, 160 g, erhält am 17. II. 0,01 Serum Sch karotal-zentral rechts. Keine Symptome.

Meerschweinchen No. 191, 150 g, erhält am 17. II. 0,05 Serum Sch. in die rechte Carotis centr. Leichte Manègebewegung gegen den Uhrzeiger, Strabismus: links Nasenspitze, rechts Schädeldach, Reflexe beiderseits erhalten. Tier ist in 5 Minuten erholt, stirbt aber in der Nacht.

Meerschweinchen No. 192, 140 g, erhält am 17. II. 0,075 desselben Serums in die rechte Carotis zentral. Sofort ist das Tier schlaff, Cornealreflex rechts erloschen, links erhalten; tot in 10 Minuten. Sektion: Lunge gebläht, stark hyperämisch.

Meerschweinchen No. 39, 250 g, erhält am 18. I. 0,1 Serum karotal-zentral links. Sofort Rollbewegungen, Strabismus: rechts Nasenspitze, links Schädeldach, rechts Cornealreflex und Lidreflex sofort erloschen, links beide erhalten. Tot in 15 Minuten.

Tabelle II.
Bestimmung der tödlichen Dosis des Antihammelblutserums Sch. von Carotis und Vene aus.

Datum	Meer-schw. No.	Ge-wicht in g	Ort der Injekt.	Menge des Serums	Tod	Symptome
19. II. 21	73	250	r. V.	0,3	1^h	Schwere Anaphylaxieerscheinungen
17. II. 21	190	160	r. C.	0,01	—	Keine Symptome
17. II. 21	191	150	r. C.	0,05	dieselbe Nacht	Leichte Manège, Strabismus
17. II. 21	192	140	r. C.	0,075	10′	Sofort schlaff, Cornealreflex r. erloschen
18. II. 21	39	250	l. C.	0,1	15′	Rollbewegung, Strabismus. Corneal- u. Lidreflex r. erloschen

Wir haben hier wie im vorigen Versuch stärkere Giftigkeit zentral-karotal als von der Vene aus. Obwohl der hämolytische Titer beider Sera der gleiche war, so ist doch das eine Serum von der Carotis aus etwa um das Doppelte giftiger als das andere. Dabei ist allerdings die Ungleichheit der Tiergewichte zu berücksichtigen. Doch haben weiter unten zu besprechende Versuche ergeben, daß eine Proportionalität zwischen Körpergewicht (Alter) und tödlicher Dosis nicht besteht.

Da auch das Ziegenhämolysin auf Hammelblut hämolytisch wirkt und andererseits auch von Meerschweinchenzellen gebunden wird, so wurde auch ein Ziegenblut-Antiserum auf seine Giftigkeit untersucht.

Kaninchen No. 20 vorbehandelt mit Ziegenvollblut intravenös. Analog dem vorigen. Hämolytischer Titer für Ziegenblut 0,0001, Hammelblut 0,0004.

Bestimmung der tödlichen Dosis karotal-zentral und intravenös.

Wir beschränken uns weiterhin darauf, die Versuche lediglich in einer Tabelle wiederzugeben unter kurzer Angabe der Symptome, und wollen das Symptomenbild nachher im allgemeinen noch einmal ausführlich im Zusammenhang schildern.

Tabelle III.
Bestimmung der tödlichen Dosis des Antiziegenblutserums No. 20 von Carotis und Vene aus.

Datum	Meerschw. No.	Gewicht in g	Ort der Injekt.	Menge des Serums	Tod	Symptome
8.XII.20	16	270	r. C.	0,008	—	Keine Symptome
17. I. 21	72	230	r. C.	0,02	48h	Typische Symptome
8.XII.20	15	260	r. C.	0,04	dieselbe Nacht	„ „
6. I. 21	52	290	r. C.	0,1	24′	Konvexität r., Rollbewegung, Manège
7. I. 21	56	380	r. C.	0,1	36h	Manège sehr intensiv. Nach 6′ erholt
5. I. 21	48	265	r. C.	0,2	30′	Konvexität r., klon. Krämpfe, Cornealreflex r. erloschen
8.XII.20	14	250	r. C.	0,3	35′	Typische Symptome
10.XII.20	19	205	l. V.	0,1	32h	Typ. Anaphylaxie, Krämpfe
10.XII.20	20	240	l. V.	0,3	6′	Krämpfe (Anaphylaxie)

Es ergibt sich aus dieser Tabelle, daß eine Dosis von 0,02 Antiziegenblutserum die karotal-zentral tödliche Grenzdosis darstellt. Von der Vene aus betrug die akut tödliche Dosis 0,1—0,3; sie war also etwa 5mal höher.

Wir haben nun weiter auch heterogenetische Sera auf ihre Wirkung von der Carotis aus im Vergleich zur Vene untersucht.

Als Beispiel sei das Serum eines Kaninchens No. K angeführt, das mit Meerschweinchenniere 3mal in 8-tägigen Intervallen vorbehandelt war. Blutentnahme 8 Tage nach der letzten Einspritzung. Hämolytischer Titer für Hammelblut 0,0008, für Ziegenblut 0,01, für Rinderblut mehr als 0,01.

Die Giftigkeit dieses Serums zeigen die Versuche der folgenden Tabelle. Sie betrug 0,05, während die tödliche Minimaldosis intravenös bei 0,3 lag. (Siehe Tabelle IV auf p. 59.)

Außer durch Organe vom Meerschweinchentypus lassen sich nach Forssman, Doerr u. a. auch durch gekochtes Hammelblut Antisera vom heterogenetischen Typ erzeugen. Auch ein solches Serum haben wir auf seine Giftigkeit geprüft.

Kaninchen No. 86, erhält am 20., 25. XII. und 3. I. je 1 ccm gekochtes gewaschenes Hammelblut intraperitoneal. Entblutet 12. I. Titer für Hammelblut 0,006.

Tabelle IV.
Bestimmung der tödlichen Dosis des Antimeerschweinchennierenserums K von Carotis und Vene aus.

Datum	Meer-schw. No.	Ge-wicht in g	Ort der Injekt.	Menge des Serums	Tod	Symptome
4. II. 21	151	240	r. C.	0,01	—	Keine Symptome
22. I. 21	90	145	r. C.	0,05	55′	Typische Symptome
26. I. 21	111	190	r. C.	0,05	20′	Strabismus, Rollbewegung. Cornealreflex r. erloschen
26. I. 21	115	200	r. C.	0,05	dieselbe Nacht	Strabismus, Rollbewegung. Cornealreflex r. erloschen
27. I. 21	120	180	r. C.	0,05	1^h	Strab., Manège, Rollbewegung. Cornealreflex r. erloschen
28. I. 21	123	540	r. C.	0,05	24^h	Strabismus, Rollbewegung. Cornealreflex r. erloschen
4. II. 21	152	240	l. C.	0,05	—	Keine Symptome
4. II. 21	153	240	l. C.	0,1	26′	Strab., Manège, Rollbewegung. Corneal- u. Lidreflex r. erlosch.
24. I. 21	—	190	l. V.	1,0	sofort	Anaphylaxiesymptome
24. I. 21	104	195	l. V.	0,5	6′	Anaphylaxiesymptome
24. I. 21	—	215	l. V.	0,3	17′	Anaphylaxiesymptome
30. I. 21	130	210	r. V.	0,1	—	Keine Symptome

20. I. Meerschweinchen No. 88, 230 g, erhält 0,1 des Serums zentralkarotal rechts, keine Symptome.

(Daß das Tier nicht etwa unempfindlich war, beweist ein zwei Tage später angestellter Versuch, in dem die Dosis von 0,2 Serum No. 20 in die linke Carotis zentral typische Symptome hervorrief.)

20. I. Meerschweinchen No. 89, 155 g, erhält in die rechte Carotis 0,3 desselben Serums in 9 Sekunden. Sofort typische Manègebewegungen, typischer Strabismus, Drehung des Kopfes nach links, Erlöschen des Cornealreflexes rechts, dann links, dann des Lidreflexes rechts, tot nach 12 Minuten.

In der nachstehenden Tabelle sind die Ergebnisse der Versuche mit diesen vier Seris noch einmal zusammengestellt.

Tabelle V.

Kan.-Serum	Tier vorbehandelt intravenös mit	Tödliche Dosis Carotis zentralwärts	Tödliche Dosis Vene	Hämolytischer Titer für Hammelblut
Sch	Hammelblut	0,05—0,075	0,3	0,0004
No. 59	Hammelblut	0,1—0,3	> 0,7	0,0004
No. 20	Ziegenblut	0,05—0,1	0,1—0,3	0,0004
K	Meerschweinchenniere	0,02—0,05	0,3—0,5	0,0008
86	gekochtem Hammelbut	0,1—0,3		0,006

Aus ihr ergibt es sich, daß die Giftigkeit dem hämolytischen Titer nicht ganz parallel geht.

Ehe nun weitere Versuche über die nähere Wirkungsweise dieser Antisera bei zentral-karotaler Einspritzung mitgeteilt werden, soll das Symptomenbild im Zusammenhang noch einmal geschildert werden. Einzelnes ergibt sich ja schon aus den als Beispiel teilweise ausführlich mitgeteilten Protokollen.

III. Das Symptomenbild beim Meerschweinchen nach karotal-zentraler Einspritzung (Obduktionsbefund).

Die durch die Kaninchenantisera beim Meerschweinchen hervorgerufenen Symptome entsprechen im großen und ganzen der Beschreibung von Forssman. Auch wir haben keinen Unterschied bei Injektion in die linke oder rechte Carotis gesehen. Die Erscheinungen treten meist sofort nach der Injektion auf, können dann zeitweilig zurückgehen, nach Stunden wiederkehren um den Tod meist noch am gleichen Tage zu bedingen. Zuweilen, besonders bei der Grenzdosis, geht ein Inkubationsstadium voraus, derart, daß die Symptome erst $^1/_2$ bis 1 Stunde nach der Injektion beginnen. Auffallend war in unseren Versuchen, daß bei über 200 Tieren bis auf ein oder zwei Fälle die Manègebewegungen immer gegen den Uhrzeiger erfolgt sind, und daß im Ruhezustand das Tier stets die vordere Körperhälfte nach links bog, oft so weit, daß die linke Kopfseite den linken Hintersckenkel berührte, so daß eine Konvexität der rechten Körperseite entstand.

Zuweilen zeigt auch der Kopf starke Opisthotonusstellung. Immer setzte das Tier einer zwangsweisen Drehung des Kopfes nach rechts den größten Widerstand entgegen. Ebenso versuchte es in der Regel, auf die rechte Körperseite gelegt, in seine ursprüngliche Stellung zurückzukehren, so daß der Körper immer zwangsweise wie ein Taschenmesser nach links herumklappte.

Bei den Manègebewegungen sind die Vorderbeine häufig gelähmt, und die Hinterbeine sind es allein, die die Bewegungen um die Vorderhand als Fixpunkt ausführen. (Zuweilen aber ist auch das Verhalten der Beine umgekehrt.) Dann liegt auch der Kopf vollkommen auf dem Tisch, immer nach links gedreht, so daß er als Stützpunkt für die die Manègebewegungen

ausführenden Hinterbeine dient. Sehr charakteristisch ist auch oft, wenn das Tier in Ruhe liegt, die Stellung der Vorderbeine. Während der Kopf intensiv nach links gedreht ist, so daß die Schnauze bis an das linke Hinterbein stößt, ist die Vorderhand nach rechts ausgestreckt, und zwar kreuzen sich die beiden Vorderbeine, wobei das linke kopfwärts vor das rechte kommt. Die Hinterhand ist dabei häufig nach links ausgestreckt. Es ist also die Wirbelsäule gewissermaßen um ihre Achse gedreht. Dabei führt auch in Ruhestellung die paretische Vorderhand fortwährend unkoordinierte schwimmartige Bewegungen aus. Die nebenstehende Fig. 1 zeigt eine derartige typische Stellung des Tieres. Zuweilen ist allerdings auch das rechte Hinterbein nach rechts zu abduziert.



Fig. 1.

Die Rollbewegungen wurden immer so eingeleitet, daß der Kopf um die Längsachse nach links gegen den Rücken hin gedreht wurde, worauf der übrige Körper nachfolgte. So entsteht eine Rollbewegung, bei der das Tier, wenn es aufrecht sitzt, zunächst auf die rechte Seite fällt, dann sich mit dem Rücken überschlägt und so fort.

Zuweilen sitzt das Tier ganz aufrecht. Der Tonus der Hinterbeine ist erhalten, auch der der Vorderbeine in schwachem Grade; jedoch ist der Kopf um die Längsachse nach links gedreht, so daß die rechte Backe auf dem Tisch liegt, und der Tonus der Halsmuskeln ist vollständig geschwunden.

Die Linksstellung des Tieres mit Ausbildung einer Konvexität nach rechts ist fast immer das erste, in leichten Fällen überhaupt das einzige Symptom.

Häufiger als die Hinterbeine sind die Vorderbeine und der Kopf gelähmt.

Hebt man dann das Tier etwas vom Tisch auf und läßt es fallen, so fangen nicht die Vorderbeine den Fall auf, sondern die Vorderhand und der Kopf fallen kraftlos auf den Tisch.

Dabei legt sich der Kopf immer nach links, während der Körper oft nach rechts herüberfällt.

In der Agone sehen wir ähnlich wie bei der Anaphylaxie kräftige Atembewegungen, ohne daß eine inspiratorische Einziehung des Thorax folgt.

In extremis kann es auch ähnlich wie bei Anaphylaxie uud Anaphylatoxinvergiftung zum Austritt von blutiger schaumiger Flüssigkeit aus Mund und Nase als Ausdruck eines beträchtlichen Lungenödems kommen.

Meistens zeigen die Tiere entweder Roll- oder Manègebewegungen. Häufig aber, wenn sich der Prozeß stundenlang hinzieht, können auch beide Typen von Zwangsbewegungen sich ablösen. Unmittelbar nach der Injektion haben wir z. B. Rollbewegungen, dann sitzt das Tier eine Zeitlang ruhig, zeigt dann plötzlich Manègebewegungen, die wieder in Rollbewegungen übergehen können, und umgekehrt.

Das linke Bein erscheint häufiger und stärker gelähmt als das rechte. Zuweilen aber haben die Beine normalen Tonus, doch es erfolgt gleichwohl intensive Manègebewegung. Manchmal bewegen sich die Tiere auch taumelnd wie betrunken nach vorwärts, wobei allerdings immer die Tendenz besteht, nach der linken Seite umzufallen.

Auffallend ist auch, daß die Tiere, um die Zwangsstellung zu paralysieren, sobald man sie in eine Kiste oder einen Käfig bringt, die Neigung haben, sich mit ihrer linken Körperseite an die Wand zu setzen.

Die Manège- und die Rollbewegungen treten immer anfallsweise auf, können aber unter Umständen, wie auch schon Forssman gezeigt hat, sehr lange andauern. Bisweilen sind Pausen von mehreren Stunden zwischen zwei Anfällen zu beobachten.

Man kann Rollbewegungen auslösen z. B. durch gewaltsame Drehung des Kopfes nach links hinten, oder indem man ein Bein aufhebt. In einem Fall gelang es z. B. nur mit dem linken Hinterbein und auch mit der linken Vorderhand, wenn das Tier auf der linken Seite lag, die Rollbewegungen herbeiführen. Legte man dies Tier auf die rechte Seite, so

gelang es von keiner Extremität aus, die Rollbewegungen in Gang zu bringen.

Meist sitzt das Tier, nach links gewandt, und setzt wegen der Konvexität nach rechts der rechten Seitenlage Widerstand entgegen. In den letzten Stadien liegt es deshalb auch wohl immer auf der linken Seite.

Selbst beim Aufrechtsitzen kann der Vorderkörper um die Längsachse torquiert sein, so daß der Kopf nach links hinten-oben gerichtet ist.

Liegen die Tiere auf der Seite oder auf dem Rücken, so führen die Beine oft unkoordinierte Schwimm- und Gehbewegungen in der Luft aus, zuweilen zeigt auch nur das eine Hinterbein fortwährend kurze Klopfbewegungen.

Auch bezüglich der Augenmuskelstörungen bestand insofern eine absolute Regelmäßigkeit, als bei nahezu allen Tieren das rechte Auge nach der Nasenspitze zu gerichtet war, das linke nach dem Schädeldach. In seltenen Fällen ist der Strabismus nur einseitig. Die Richtung der Augen rechts nach vorn unten, links nach oben entspricht auch der häufigsten Haltung der Vorderbeine, wenn das Tier auf der Seite liegt. Ferner war in allen Fällen unmittelbar nach der Injektion, bzw. mit Eintritt der Symptome, der Cornealreflex zunächst nur rechts, nicht aber links gestört. In der Regel ist er dabei zunächst verlangsamt, häufig aber auch gleich erloschen. Dabei bestand rechts, bisweilen aber auch links, ausgesprochener Exophthalmus. Bei stärkerer Vergiftung erlosch neben dem Corneal- auch der Lidreflex, zuerst rechts. Beide konnten, sofern das Tier sich erholte, wiederkehren. Blieb das Tier etwas länger leben, so zeigte die Cornea des rechten Auges wohl wegen des mangelnden Lidschlages und der Unempfindlichkeit deutliche Trübung.

Zuweilen starke Ptosis der Lider. Kehren die geschwundenen Reflexe wieder, so geschieht das in umgekehrter Reihenfolge, wie beim Verschwinden. Zuerst ist der Lidreflex wieder vorhanden.

Forssman hat das Erlöschen des Cornealreflexes und den Exophthalmus nur unter Verwendung eines Serums gesehen. Wir fanden eine entsprechende Wirkung stets bei allen un-

seren Seris. Ja, bei kleinen Dosen waren die Augensymptome neben der Linksstellung des Körpers oft die einzigen Zeichen der Intoxikation.

Das Blut ist bei der Obduktion unmittelbar nach dem Tode nicht geronnen. Auch konnten wir namentlich im Gehirn in Schnittpräparaten keine Thrombenbildung nachweisen. Ueberlebten die Meerschweinchen die Vergiftung, so zeigten sie in den folgenden Wochen, oft schon nach Tagen, kolossale Gewichtsabnahme. In der Regel aber gingen die Tiere unter immer wiederholten Roll- und Manègebewegungen zuletzt in Seitenlage unter kurzen klonischen Krämpfen ein, oft nach Minuten oder Stunden, meist spätestens innerhalb 24 Stunden.

Temperatursenkung tritt wie bei der Anaphylaxie ein. Wir haben die Tiere mangels an Hilfspersonal nicht in jedem Falle messen können. Doch zeigt die nachstehende Tabelle, daß Temperatursenkungen selbst bis um 10° gegen die Normaltemperatur innerhalb einer Stunde durch kleine Dosen der giftigen Sera auch karotal-zentral erzielt werden.

Tabelle VI.

Temperaturtabelle.

No.	Dosis	Ort	Nach Std.	Temperatur
9	0,1 Serum No. 59	l. C.	$2^1/_4$	33°
10	0,2 dgl.	r. C.	2	35° 7′
11	0,2 „	r. C.	2	24° 5′
12	0,3 „	r. C.	$1^1/_4$	29° 5′
15	0,04 Serum No. 20	r. C.	1	32° 5′
17	0,1 dgl.	Aorta	1	27° 5′
19	0,1 „	l. V.	1	32°
22	0,5 Norm.-Ziegenser.	r. V.	1	30° 7′

Dieses sind die Symptome, wie wir sie fast ausnahmslos in allen Fällen gesehen haben. Bei einigen Versuchen mit Gefäßunterbindungen (s. unten) konnten allerdings die Roll- und Manègebewegungen und ebenso die Augenstellungen umgekehrt sein.

Nur in einem einzigen Fall ohne Unterbindung, in dem allerdings nicht das volle Serum, sondern eine größere Menge der Globulinfraktion injiziert war, haben wir die Roll-

bewegungen sowohl wie die Manègebewegungen umgekehrt wie sonst, das heißt, die Manège im Sinne des Uhrzeigers gesehen, die Rollbewegungen in der Richtung Bauch, linke Seite, Rücken.

Bei einem Tier, bei dem die Manège- und Rollbewegungen im entgegengesetzten Sinne wie sonst verliefen, war auch der Cornealreflex nicht rechts, sondern links erloschen.

In einem anderen Fall bei typischem Verhalten der Zwangsbewegungen und des Strabismus war der Cornealreflex links einen Augenblick erloschen und rechts vorhanden. Bei einer weiteren Prüfung 15 Minuten nach der Injektion waren die Verhältnisse wieder wie gewöhnlich (Cornealreflex nur rechts erloschen) (Meerschweinchen No. 65).

Der Sektionsbefund bietet bei den Tieren, abgesehen von dem Verhalten der Lunge, wenig Charakteristisches. Diese ist beim akuten Tod ziemlich stark gebläht, wenn auch nicht so ausgesprochen wie bei der typischen Anaphylaxie, oft hämorrhagisch, ödematös, nicht selten finden sich zirkumskripte, stecknadelkopf- bis linsengroße hämorrhagische Herdchen. Wird die Sektion bald nach dem Tod vorgenommen, so schlägt das Herz noch stark, so daß wir nicht Herzparese (Forssman) als Todesursache annehmen möchten.

Das Blut ist ungeronnen, auch in der Aorta. Bei mikroskopischen Schnitten durch das Gehirn konnten wir auch da in den Gefäßen keinerlei Gerinnung wahrnehmen.

Die Gehirnhäute sind oft injiziert, zuweilen rechts stärker als links.

Auffallend ist häufig eine starke Blässe der Nebennieren, nur sehr selten leichte Rötung.

Tritt der Tod subakut ein, so fällt eine außerordentlich starke Abmagerung der Tiere auf, die innerhalb von 2 Tagen fast $^{1}/_{3}$ des Körpergewichts betragen kann.

Das Protokoll eines solchen Tieres (No. 72) sei kurz wiedergegeben.

Meerschweinchen No. 72, 230 g, erhält in die rechte Carotis am 17. I. 21 0,02 ccm Serum No. 20 in 9 Sekunden injiziert.

Nach 1 Minute typische Rollbewegungen, Manègebewegung gegen Uhrzeiger; Strabismus, linkes Auge nach Schädeldach, rechtes nach Nasenspitze, Reflex links erhalten, rechts erloschen, nach 15 Minuten scheinbar

erholt, nach 30 Minuten wieder deutlich typische Rollbewegungen, dann etwas erholt.

19. I. Tier ist stark abgemagert und kalt, moribund, stirbt. Gewicht 150 g. Sektionsbefund: Darm und Peritoneum nicht injiziert; Nebenniere leicht injiziert, Herz kein Gerinnsel. Lunge hier nicht gebläht, stark injiziert, keine hämorrhagischen Flecken.

Dieser Versuch gibt uns ein Bild von der kolossalen Giftigkeit des Serums, das in dieser Menge innerhalb von 2 Tagen einen Gewichtsverlust von 80 g zur Folge hat. Das zeigt einen gewissen Gegensatz zur Anaphylaxie, wo nach Ueberstehen der akuten Symptome die Tiere wieder völlig gesund werden oder, wenn sie subakut eingehen, doch nie solche Gewichtsverluste in kürzester Zeit haben.

IV. Ueber den Weg des zentral-karotal eingespritzten Serums und seine Angriffsstelle.

1. Unterbindungsversuche.

Forssman führt, wie schon gesagt die Symptome lediglich darauf zurück, daß die wirksame Substanz plötzlich an das Kleinhirn herantritt und hier verankert wird.

Das Krankheitsbild soll bei der zentral-karotalen Applikation des Serums durch die besonderen Kreislaufverhältnisse des Meerschweinchens bedingt werden. Forssman hat diese eingehend beschrieben und darauf hingewiesen, daß beim Meerschweinchen von der Aorta der Truncus anonymus, von diesem die beiden Carotiden, sowie rechts die Subclavia abgehen, während die linke Subclavia direkt aus der Aorta entspringt. Von beiden Subclaviae zweigen sich dann ihrerseits die Arteriae vertebrales ab (s. Fig. 2).

Wird nun in eine der beiden Karotiden zentralwärts injiziert, so gelangt nach Forssman das eingespritzte Serum, da es im Truncus dem entgegengesetzt gerichteten mächtigen Blutstrom aus der Aorta begegnet, nicht in den allgemeinen Kreislauf, sondern durch die andere Carotis und Subclavia dextra und Vertebralis dextra, wie Forssman annimmt, nach dem Kleinhirn.

Einen entsprechenden Weg nimmt aber nach ihm auch das Serum, wenn man beide Carotiden peripher unterbindet und karotal-zentral injiziert.

Wir haben auch unsererseits die Versuche in dieser Richtung noch weiter, soweit es nur die anatomischen Verhältnisse ermöglichten, variiert und wollen im Nachstehenden darüber berichten.

a) Unterbindung der rechten Arteria subclavia.

Es gelang uns beim Meerschweinchen bei einiger Uebung tiefer, wie es Forssman getan hat, die Carotiden freizulegen und bis zur Vereinigungsstelle der beiden Carotiden an den Truncus anonymus heranzukommen. Hier kann man nun rechts noch außerhalb des Thorax mit Sicherheit die Arteria subclavia dextra erreichen und sie von ihrer Ausgangsstelle vom Truncus anonymus bzw. von der rechten Carotis aus bis zum Abgang der Arteria vertebralis freilegen. Unmittelbar vor deren Abgang bei *e* haben wir nun abgebunden und dann wie in der Regel in die rechte Carotis injiziert. Dabei vermag das Blut natürlich nicht mehr durch die Vertebralis dextra nach dem Gehirn zu gelangen; und wenn es nun im Truncus anonymus, wie Forssman wohl mit Recht annimmt, gegen den Blutstrom stößt, der sich aus dem Herzen dorthin und nach der Aorta ergießt, so ist es auch wenig wahrscheinlich, daß das Injektionsgut nun in die linke Subclavia hineingelangt und von da in der linken Vertebralis in nennenswerter Weise emporsteigt. Viel wahrscheinlicher ist es, daß das Blut im wesentlichen in die linke Carotis hinaufsteigt.

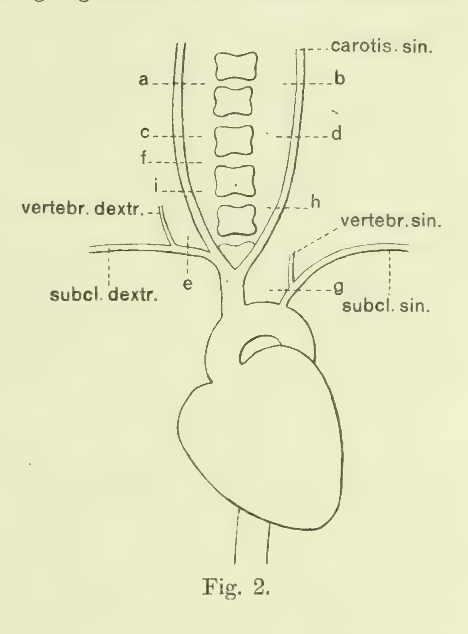


Fig. 2.

Trotzdem haben wir, wie die nachstehenden Versuche

ergeben, nach Unterbindung der rechten Subclavia auch mit 0,1 des Serums 20, das heißt höchstens dem Doppelten der tödlichen Dosis, typische Vergiftung bei zentral-karotaler Einspritzung gesehen.

Wir lassen diesen Versuch folgen.

Bei Meerschweinchen No. 55 (400 g) wird die rechte Arteria subclavia unterbunden. $^{3}/_{4}$ Stunde später, nachdem sich das Tier inzwischen von der Operation völlig erholt und keinerlei Erscheinungen gezeigt hat, wird 0,1 Antiziegenblut-Kaninchenserum No. 20 in 0,5 Volum rechts karotalzentral gespritzt. Sofort Seitenlage und starke Lähmung der Hinterhand. Klonische Zuckungen des linken Hinterfußes. Nach 2 Minuten legt sich das Tier auf die rechte Seite. Der Muskeltonus ist fast verschwunden, dann etwas erholt. Nach 6 Minuten erneute Zuckungen, Kopf geht nach links bis an die Hinterbeine, stärkste Konvexität rechts, das Tier ist zusammengeklappt, die Vorderbeine sind völlig gelähmt. Nach 12 Minuten Manègebewegungen gegen den Uhrzeiger. Rollbewegungen atypisch, rechte Seite, Bauch, linke Seite. Nach 15 Minuten Strabismus, gleichfalls atypisch, rechts Schädeldach, links Nasenspitze. Das Tier sitzt dann mit der Hinterhand aufrecht, Vorderhand und Kopf ist um die Längsachse gedreht und gleichfalls atypisch gestellt, denn der Kopf ruht dabei auf der linken Backe. Auch in der Haltung der Vorderbeine zeigt sich ein Spiegelbild des sonstigen Verhaltens. In dieser Stellung bleibt das Tier noch in beständigen Zuckungen, bis etwa nach 45 Minuten der Tod eintritt. Obduktion: Nebenniere blaß, Darm desgleichen, die Lungen etwas gebläht, mäßig injiziert, kleine hämorrhagische Flecke.

Es muß also in diesem Versuch das Serum auf einem anderen Wege als durch die rechte Vertebralis ins Gehirn gelangt sein, und zwar, wie die Umkehrung des Symptomenbildes ergibt, nicht in die Gehirnhemisphäre, in der sonst das Serum in erster Linie zu wirken pflegt. Vielleicht ist es doch teilweise durch die linke Vertebralis gegangen, oder es bestanden Anastomosen nach der rechten Vertebralis hin oder direkt vom Truncus anonymus ins Gehirn. Allerdings spricht die Umkehrung der Symptome zunächst nicht für den gewöhnlichen Weg.

Wenn wir aber bedenken, daß in allen anderen Versuchen in gleicher Richtung mit Einspritzung von allerdings zumeist größeren Mengen von Serum, auf das Körpergewicht berechnet, die Erscheinungen wie gewöhnlich verliefen, so macht auch diese Erklärung Schwierigkeiten. Zudem vereinigen sich ja bekanntlich beide Vertebrales in der gemeinsamen

Arteria basilaris, durch die die Injektionsflüssigkeit weiter strömen muß, was auch der Erklärung der einseitigen Wirkung im allgemeines Schwierigkeiten bereitet, denn die Communicans posterior, die mit beiden Carotiden kommuniziert, kann hier kaum in Frage kommen, weil, wie schon Forssman gezeigt hat, und wie wir bestätigen können, die Unterbindung beider Carotiden peripher bei *a* und *b* oder *c* und *d* die Tiere nicht vor der Vergiftung schützt.

Das zeigt der folgende Versuch:

b) Unterbindung beider Carotiden.

6. I. Meerschweinchen No. 60, 350 g, Unterbindung der linken und rechten Carotis bei *a* und *b*. Tier verträgt die Operation ohne jede Störung. Nach 1 Stunde rechts karotal-zentral 0,1 ccm Antiziegenblut-Kaninchenserum No. 20. Sofort typische Rollbewegungen, Kopf nach links gedreht. Strabismus typisch. Nach 3 Minuten rechter Cornealreflex erloschen. Nach 4 Minuten Manègebewegungen gegen den Uhrzeiger. Körper fällt auf die linke Seite. Nach 5 Minuten Strabismus links verschwunden, rechts erhalten. Nach 6 Minuten sitzt Tier wieder nach links zusammengeklappt. Nach 15 Minuten Rollbewegungen typisch. Tod nach 3 Stunden. Sektion typisch, leichte Injektion der Gehirnhäute.

c) Unterbindung beider Carotiden und gleichzeitige Unterbindung der Arteria subclavia dextra.

Meerschweinchen No. 59, 285 g. Zunächst wird die Arteria subclavia rechts bei *e* unterbunden, sodann die linke Carotis so nah wie möglich dem Truncus anonymus (bei *h*) abgeklemmt. Unterbindung der rechten Carotis kopfwärts (bei *a*), Injektion karotal-zentral 0,1 ccm in 0,5 Volum des Kaninchenserums No. 20. Danach wird unmittelbar unter der zentralen Unterbindungsstelle *c* 0,5 ccm Kochsalzlösung nachgespritzt (bei *f*), um das injizierte Serum möglichst in die Aorta hineinzudrücken, und noch weiter unten (bei *i*) unterbunden.

Nach 5 Minuten starke Manègebewegungen gegen den Uhrzeiger, jedoch kein Strabismus. Taumeln, Dyspnoë, nach 15 Minuten tot. Lunge kaum gebläht, hyperämisch, Herzblut ungeronnen. Nebenniere nicht injiziert.

Auch in diesem Falle hat also vielleicht wiederum ähnlich wie im ersten Versuch mit alleiniger Unterbindung der Subclavia dextra und der rechten Carotis das Injektionsserum den Weg nach dem Gehirn gefunden, aber vielleicht nicht die Stelle erreicht, von der der Strabismus ausgelöst wird, da er auffallenderweise bei diesem Tiere fehlt.

d) Versuch einer Absperrung beider A. subclaviae.

Die anatomischen Verhältnisse erlauben es nicht, die intrathorakal gelegene linke Subclavia ohne weiteres freizulegen und zu unterbinden. Immerhin haben wir nach Unterbindung der rechten Subclavia versucht, mittels einer Klemme von der oberen Thoraxapertur aus die linke Subclavia zu fassen, vermögen aber nicht mit Sicherheit zu sagen, ob es uns gelungen ist, während wir bei allen Unterbindungsversuchen durch nachherige Präparierung der Gefäße uns jedesmal von dem Erfolg der Unterbindung einwandfrei überzeugen konnten.

Gleichwohl sei dieser Versuch hier mitgeteilt, da ja zum mindesten doch in ihm die rechte Subclavia mit Sicherheit unterbunden worden ist. Dauer der Operation 25 Minuten.

Meerschweinchen No. 54, 370 g, erhält 0,1 ccm des gleichen giftigen Serums wie das vorige Tier in die rechte Carotis zentralwärts nach vorgenommenen Unterbindungen bei *e* bzw. Abklemmung der Subclavia sinistra (?).

Sofort Rollbewegungen, Exophthalmus rechts. Cornealreflex links erloschen statt sonst rechts. Tot in 9 Minuten. Sektionsbefund: Lunge nicht deutlich gebläht, hyperämisch mit hämorrhagischen Punkten, sonst ohne Besonderheiten.

Wir haben also auch hier vielleicht wie bei der alleinigen Unterbindung der Subclavia dextra insofern ein Spiegelbild des sonstigen Symptomenkomplexes, als der Cornealreflex zunächst am linken Auge statt am rechten erloschen ist. Da wegen der schwierigen anatomischen Verhältnisse die Abklemmung der linken Subclavia nicht sicher ist. so ist dieser Versuch nur als Bestätigung der voraufgegangenen mit den Tieren No. 49, 50, 51 und 55 zu betrachten.

Im Nachstehenden bringen wir eine Uebersichtstabelle über die Unterbindungsversuche (auf p. 71).

2. Langsame Injektion und Injektion in größerem Volum.

a) Einfluß der Dauer der Einspritzung auf die Vergiftung.

Bei der Anaphylaxie gelingt es, wie Friedberger und

Tabelle VII.
Unterbindungsversuche.

Datum	Meerschw. No.	Gewicht in g	Unterbindung	Ort der Injektion	Serum No.	Menge des Serums	Tod	Symptome
7. I. 21	55	400	r. Subcl.	r. C.	20	0,1	45′	Zuckungen, Konvexität r., Manègeb., Rollb., Strab.
6. I. 21	51	290	"	"	20	0,1	35′	Anf. keine Symptome, nach 15′ Zuck., Manège., Rollb.
6. I. 21	50	305	"	"	20	0,2	30′	Konv. r., Krampf, Dyspnoë
5. I. 21	49	295	"	"	20	0,3	8′	Manègeb. m. Uz., Tonus θ
10. I. 21	59	285	" u. l. Car.	"	20	0,1	15′	Manègebew., Dyspnoë
6. I. 21	60	350	beid. Car.	"	20	0,1	3h	Rollb., Strab., Cornealrefl. r. erlosch., Manègebew.
6. I. 21	54	370	beide Subcl. (?)	"	20	0,1	9′	Rollb., Augenrefl. erlosch.

Mita[1]) sowie Friedberger[2]) gezeigt haben, durch sehr langsame Injektion des Antigens selbst das 10—20-fache der tödlichen Dosis einzuspritzen. Es wurde das mit einer partiellen Absättigung der Antikörper durch die ersten in das Blut hinein gelangenden Antigenmengen, also durch eine Art von Antianaphylaxie, erklärt.

Bei der Einspritzung des primär giftigen Antiserums war ein ähnliches Verhalten, sofern die Vergiftung lediglich auf der durch die besonderen Kreislaufverhältnisse bedingten Zufuhr und Affinität des giftigen Serums zu ganz bestimmten Gehirnstellen beruhte, nicht zu erwarten, denn es müßte ganz einerlei sein, ob das giftige Serum auf einmal oder nach und nach an die betreffende Stelle gelangt.

Tatsächlich ergeben dann einige Versuche, die in der folgenden Tabelle VIII zusammengestellt sind, daß bei langsamer Injektion das Vierfache der tödlichen Dosis das typische Vergiftungsbild und den Tod hervorruft, während allerdings die doppelte tödliche Dosis ohne nennenswerte Symptome vertragen wird.

Von einem anderen Serum schützte aber ein geringes Multiplum der tödlichen Dosis nicht. Es traten die typischen

1) Friedberger und Mita, Deutsche med. Wochenschr., 1912, No. 5.
2) Friedberger, Münch. med. Wochenschr., 1918, No. 48.

Tabelle VIII.
Einfluß der Injektionszeit und des Volumen bei karotal-zentraler Injektion giftiger Antisera.

Datum	Meerschw. No.	Gewicht in g	Ort der Injektion	Zeit	Serum	Menge des Serums	Tod	Symptome
				Schnelle Injektion				
5. II. 21	167	210	r. C.	2"	K	0,1	—	Keine Symptome
5. II. 21	168	220	r. C.	2"	K	0,2	15'	Exoph. r., Strabism. l., Cornealreflex r. erl.
5. II. 21	169	220	r. C.	1"	K	0,1	—	Keine Symptome
				Langsame Injektion				
8. XII. 20	13	215	r. C.	5'	No. 59	0,38	13'	Sofort Parese
4. II. 21	155	250	r. C.	7'	K	0,1	—	Nur leichte Anaph.-Symptome
4. II. 21	156	240	r. C.	11'	K	0,2	mbd. getötet	Strab., Rollb., Manège, beide Refl. r. erlosch.
				Kontrolle				
5. II. 21	170	190	r. C.	5"	K	0,05	—	Rollb., Strab., Manège, Cornealrefl. r. erlosch.
				Versuch mit hochgradig verdünntem Serum				
4. II. 21	157	240	r. C.	20"	K	0,1 in 4,0 Vol.	20'	Rollb., Manège., Strab., Beide Refl. r. erlosch.

Augenerscheinungen und Tod innerhalb 13 Minuten ein. Allerdings betrug hier auch die Injektionszeit nur 5 Minuten.

b) Einfluß des Volums.

Bei der Anaphylaxie ist nach den Untersuchungen von Friedberger und Tassawa[1]) bekannt, daß bei der Reinjektion des Antigens in einem größeren Volumen das 2- bis 3-fache Multiplum der tödlichen Dosis vertragen wird.

In der jetzigen Versuchsanordnung ist ein entsprechender Einfluß nicht zu konstatieren und war wohl auch aus den bei der langsamen Injektion angegebenen Gründen von vornherein nicht zu erwarten. Wenigstens erlag ein Meerschweinchen der doppelten tödlichen Dosis des Serums K unter typischen Erscheinungen in kurzer Zeit.

1) Friedberger und Tassawa, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 19. 1913, Heft 4.

4. II. Meerschweinchen No. 157, 240 g, erhält in die rechte Carotis 0,1 ccm Serum K in 4 ccm Volumen. Sofort typische Rollbewegungen, typische Körperstellung und Strabismus. Cornealreflex und Lidreflex rechts erloschen, links beiderseits zunächst erhalten. Tod in 20 Minuten.

3. Einspritzung des Serums in die Aorta.

Schon Forssman hat vermutet, daß, wenn es sehr schnell gelingt, die Injektionsflüssigkeit in den breiten Aortenstrom hineinzubringen, die Symptome ausbleiben würden.

Wir haben dabei die Kanüle von *i* aus möglichst tief in die rechte Carotis eingeführt und sehr schnell (1—2 Sekunden) injiziert. So vertragen die Tiere, tatsächlich das Doppelte, nicht aber mehr das Vierfache der Dosis, die, etwas langsamer (5 Sekunden) injiziert, tötet.

Weiterhin haben wir in einem Versuch beim laparotomierten Tier das Serum peripherwärts in die Bauchaorta eingespritzt, wobei wir uns einer sehr feinen Kanüle bedienten und nachher die Injektionsstelle der Wand etwas klemmten, wodurch Blutungen vollkommen vermieden wurden.

9. XII. Meerschweinchen No. 17, 270 g, erhält 0,1 ccm ziegenhämolytisches Serum No. 20 in die Bauchaorta in 8 Sekunden injiziert. Keine Symptome. Temperatur nach 1 Stunde 27,5°.

Wir haben also hier lediglich die temperaturherabsetzende Wirkung, die solche Sera auch von der Vene aus zeigen.

4. Einspritzung des Serums ins Herz.

Bei direkter Einspritzung ins Herz liegen die Verhältnisse nicht anders. Das zeigt die nachstehende Tabelle.

Tabelle IX.
Injektion giftiger Antisera ins Herz.

Datum	Meerschw. No.	Gewicht in g	Ort der Injektion	Serum	Menge des Serums	Tod	Symptome
22. I. 21	91	155	l. Herz	K	0,05	—	Keine Symptome
5. II. 21	161	220	l. Herz	K	0,1	—	,, ,,
5. II. 21	162	210	l. Herz	K	0,3	—	,, ,,
5. II. 21	163	210	r. Herz	K	0,3	—	Anaph. Symptome

Aus der Tabelle ergibt sich, daß die 6-fache tödliche Dosis, ins Herz gespritzt, keine typischen Symptome auslöst.

Bei einem Meerschweinchen No. 163 traten allerdings bei der Einspritzung von 0,3 ccm Serum K ins rechte Herz Krämpfe und Tod ein. Hier handelt es sich aber um typische anaphylaktische Symptome, wie das nachfolgende Protokoll zeigt.

5. II. 21. Meerschweinchen No. 163, 210 g, erhält in rechtes Herz 0,3 ccm Serum K. Sofort Krämpfe in Seitenlage, anaphylaktisch. Reflex beiderseitig erhalten, kein Strabismus. Nach 2 Minuten Cornealreflex und Lidreflex beiderseitig erloschen, nach 2,5 Minuten tot an akuter typischer Anaphylaxie. Sektionsbefund: Lunge ziemlich injiziert, gebläht, Herz schlägt noch.

Daß das Serum wirksam und die Tiere empfänglich waren, zeigt der folgende Versuch, in dem am Tage nach der Injektion der 6-fach tödlichen Dosis ins linke Herz, die anstandslos vertragen worden war, 0,1 karotal-zentral typische Symptome hervorrief.

5. II. Meerschweinchen No. 162, 210 g, linkes Herz 0,3 Serum K, keine Symptome (s. Tabelle IX). II. Behandlung 6. II.: Rechte Carotis zentral 0,1 Serum K. Sofort Rollbewegungen, Körper nach links torquiert. Strabismus rechts nach Nasenspitze, links Schädeldach. Cornealreflex und Lidreflex rechts erloschen, links erhalten. Manègebewegungen gegen den Uhrzeiger. Tod nach 6 Stunden.

5. Direkte Injektion der Antisera ins Gehirn.

Da das Serum ja nach dem ganzen Symptomenkomplex bei der karotal-zentralen Einspritzung auf das Zentralnervensystem wirken mußte, so lag es nahe, auch den Einfluß bei direkter Einspritzung in die Gehirnsubstanz zu untersuchen.

Da wir mit Forssman die Angriffsstelle des Serums zunächst im Kleinhirn vermuteten, so haben wir möglichst in die betreffende Gegend, tunlichst auch in das Kleinhirn selbst injiziert. Wir lassen entsprechende Versuche folgen.

19. II. Meerschweinchen No. 197, 250 g, erhält 0,1 Serum Sch. subdural. Sofort starke Linkskonvexität, Manègebewegungen mit Uhrzeiger, Cornealreflex erhalten, nach 2 Minuten Tier erholt. Nochmalige Injektion der gleichen Dosis subdural: Taumelbewegungen, kein Strabismus, Reflexe beiderseits erhalten, bald erholt.

19. II. Meerschweinchen No. 84, 310 g, erhält 0,05 Serum Sch. intracerebral (Kleinhirn) rechts. Rollbewegungen, starke Manègebewegungen gegen Uhrzeiger, Cornealreflex erhalten. Tier sitzt nach 3 Minuten wieder gerad, Symptome absolut nicht typisch, Tonus immer vollständig erhalten.

Nach 5 Minuten erneute atypische Krämpfe, bald erholt. Nach 45 Minuten Reflexe erhalten, ebenso Tonus, keine Spur von typischen Symptomen, wohl aber ist die Beinstellung die gleiche wie sonst, wenn das Tier auf der Seite liegt, auch starke Rechtskonvexität; tot nach 3 Stunden.

19. II. Meerschweinchen No. 205, 280 g, erhält 0,1 physiolog. NaCl-Lösung intracerebral (Kleinhirn). Krämpfe, Rollbewegung, starke Konvexität links und rechts abwechselnd („Taschenmesserstellung"), kein Strabismus, alle Reflexe erhalten.

Wie sich aus den Protokollen ergibt, traten sowohl bei subduraler wie bei intracerebraler Injektion Manègebewegungen, auch Rollbewegungen und „Taschenmesserstellung" auf. Doch ähneln die Symptome absolut nicht denen bei karotal-zentraler Einspritzung; vor allem fehlt der Strabismus. Die Erscheinungen sind wohl teils durch den mechanischen Insult und Druck bedingt, denn sie finden sich auch nach intracerebraler Kochsalzinjektion in die Kleinhirngegend.

V. Einige die karotal-zentrale Serumgiftigkeit beeinflussende Faktoren.

1. Einfluß des Alters (Gewichts) der Tiere auf die Giftwirkung bei zentral-karotaler Einspritzung.

Friedberger und Simmel[1]) haben bei der aktiven Anaphylaxie die merkwürdige Beobachtung gemacht, daß neugeborene Meerschweinchen nach der aktiven Präparierung 8—10mal weniger empfindlich gegenüber der Reinjektion von artfremdem Eiweiß waren als Tiere von 200—300 g Körpergewicht.

Ein Unterschied in entsprechendem Grade fand sich bei passiver Anaphylaxie und Anaphylatoxinvergiftung nicht; er wurde deshalb im wesentlichen auf unvollkommene Bildung des anaphylaktischen Antikörpers bei ganz jungen Tieren zurückgeführt.

Danach war es von vornherein nicht zu erwarten, daß gegenüber der karotal-zentralen Einspritzung neugeborene Meerschweinchen weniger empfindlich seien als ältere.

Wir haben Versuche mit 60—75 g schweren Tieren angestellt unter Verwendung des Serums Sch., dessen tödliche Dosis bei Tieren von 250—300 g 0,05—0,075 betrug.

---

1) Friedberger und Simmel, diese Zeitschr., Bd. 19, 1913, p. 460.

Die nachstehende Tabelle zeigt die Ergebnisse bei den kleinen Tieren.

Tabelle X.
Versuche mit kleinen Meerschweinchen.

Datum	No. des Meerschw.	Gewicht in g	Serum	Ort der Injektion	Dem Gewicht proportional tödlich. Dosis	Die gegebene Dosis	Das sind Multipla der Gewichtsdosis	Tod	Symptome
	207	70	Sch.	r. C.	0,02	0,04	2,0	24ⁿ	Typ. Körperstellung, Manège- und Rollbewegung
	206	70	„	dgl.	0,02	0,05	2,5	24ʰ	Typ. Körperstellung
	200	70	„	„	0,02	0,05	2,5	—	Keine besond. Sympt.
	202	60	„	„	0,017	0,075	4,4	1ʰ	Typische Symptome
	201	75	„	„	0,021	0,1	4,8	sofort	Sofort schlapp

Aus der Tabelle X ergibt sich, daß junge, wenige Tage alte Tiere das Serum bedeutend besser vertragen als ältere. Rechnet man die tödliche Dosis für Tiere mittleren Gewichts von 200—250 g mit 0,07, so hätte für 60—70 g schwere Tiere die tödliche Dosis 0,017 bzw. 0,02 betragen müssen. Wir sehen aber, daß die kleinen Tiere unter Umständen die $2^1/_2$- bis $3^1/_2$-fache tödliche Dosis vertragen oder doch wenigstens erheblich verzögert sterben.

Es besteht also jedenfalls keine strenge Proportionalität zwischen Dosis und Körpergewicht, weshalb wir auch von entsprechender jedesmaligen Umrechnung der Dosis auf das Körpergewicht in unseren Versuchen abgesehen haben.

2. Einfluß der Vagusdurchschneidung.

Nach Friedberger und Gröber[1]) wird bei der Anaphylaxie ein Schutz gegenüber der tödlichen Dosis durch die Vagotomie erzeugt. Die Autoren diskutierten die Möglichkeit, daß die Symptome zentral durch die Reizung des Vaguszentrums, bedingt durch Druckdifferenzen in der Schädelkapsel infolge primärer Gefäßschädigung, ausgelöst werden.

Wir haben nun auch bei der karotal-zentralen Einspritzung den Einfluß der Vagusdurchschneidung studiert. Das Ergebnis zeigt die folgende Tabelle.

1) Friedberger und Gröber, diese Zeitschr., Bd. 19, 1913, S. 429.

Tabelle XI.
Giftigkeit des Serums K nach karotal-zentraler (rechts) Einspritzung bei voraufgegangener Vagusdurchschneidung.

Datum	Meer-schw. No.	Ge-wicht in g	Vagus	Menge des Serums	Tod	Symptome
26. I. 21	113	230	beide Vagi durchschnitten	0,05	—	Rollbeweg., Strabismus, Cornealreflex typisch, nach 5' erholt
26. I. 21	114	210	30' vor Inj. Vagi durchschnitten	0,05	7'	Strabismus, Cornealreflex
26. I. 21	112	220	beide Vagi durchschnitten	0,075	10'	Rollbeweg., Strabismus, Cornealreflex
26. I. 21	115	200	Kontrolle	0,05	in der Nacht	Rollbeweg., Strabismus, Cornealreflex

Aus der Tabelle XI ergibt sich, daß die Vagusdurchschneidung nicht nachweisbar vor der sicher tödlichen Dosis schützt. Ein Tier ist zwar zunächst am Leben geblieben, ein anderes aber (No. 14) bedeutend schneller eingegangen als die Kontrolle.

3. Einfluß der Narkose.

Auch den Einfluß der Narkose haben wir in Analogie mit den entsprechenden Versuchen bei der typischen Anaphylaxie untersucht. Hier hat bekanntlich zuerst Besredka[1]) einen wesentlichen Einfluß postuliert und daraus weitgehende Schlüsse über die Angriffsstelle des Anaphylatoxins im Organismus gezogen.

Nach eigenen Untersuchungen des einen von uns mit Mita läßt sich allerdings bei größeren Versuchsreihen mit quantitativer Methodik der Einfluß der Narkose nicht deutlich erkennen.

Auch bei der karotal-zentralen Einspritzung von giftigen Antiseris ist er in tiefer Narkose durch Chloroform, wenn überhaupt, nur in geringem Grade vorhanden, wie das die nachstehende Tabelle XII zeigt.

---

1) Besredka, Compt. rend. Soc. Biol., T. 62, 1907; Annales Inst. Past., T. 21, 1907, p. 950.

Tabelle XII.

Meerschweinchen tief narkotisiert, danach Einspritzung karotal-zentral (rechts). Bei der Chloroformnarkose wird die Chloroformgabe mehrmals wiederholt, sobald der Schlaf aufhört.

a) Chloroformversuch.

Datum	Meerschw. No.	Gewicht in g	Mit oder ohne Chloroform	Serum	Menge des Serums	Tod	Symptome
27. I. 21	117	250	mit	K	0,05	—	Rollbewegung, Manège, Strabismus, Cornealreflex typisch
27. I. 21	116	270	„	K	0,07	8′	Typ. Stellung, aber wegen der Narkose von Anfang an schlapp
27. I. 21	121	170	„	K	0,05	1h	Strabismus, Cornealreflex typisch
27. I. 21	120	180	ohne	K	0,05	1h	Rollbewegung, Manège, Strabismus, Cornealreflex typisch
29. I. 21	128	305	„	K	0,05	—	Strab., Cornealreflex, nach 8′ erholt
29. I. 21	129	200	„	K	0,06	2½h	Starke Anaphylaxie, Krämpfe durch Narkose verschwunden

b) Urethanversuch.

Datum	Meerschw. No.	Gewicht in g	20% Urethan (subkutan)	Zeit zwischen Urethan-injektion und Seruminjekt.	Serum	Menge des Serums	Tod	Symptome
25. II. 21	215	250	2,0	25′	Sch.	0,15	17′	Strab. beiderseits, beide Reflexe r. erloschen
25. II. 21	216	175	2,0	25′	„	0,1	40′	Ohne besond. Symptome, ganz schlapp
25. II. 21	211	230	1,5	30′	„	0,1	in der Nacht	Strab. beiderseits, beide Reflexe r. erloschen
25. II. 21	217	175	2,5	—	—	—	dgl.	Ohne besond. Symptome

Es gelang also nicht sicher, Tiere gegen die einfach tödliche Dosis zu schützen. Allerdings waren die Symptome durch die Chloroformwirkung teilweise maskiert. Namentlich ging unter Narkose der Strabismus zurück. Da das aber auch sonst hier und da zeitweilig beobachtet wurde, so können wir das nicht in jedem Fall mit Sicherheit auf die Narkose zurückführen.

Jedenfalls aber beobachteten wir auch, daß in der Narkose die typische Zwangsstellung und starke Tonusvermehrung nachließ, nach dem Erwachen jedoch wiederkehrte und dann

durch erneute Narkose teilweise wieder beseitigt werden konnte.

Vielleicht wirkt das Urethan, das wir gleichfalls angewandt haben (Tab. XII a), etwas günstiger. Die Maximaldosis, die an sich vertragen wird, beträgt für Tiere von ca. 200 g 2,0 der 20-proz. Lösung subkutan. 2,5 ccm tötet bereits in 24 Stunden (siehe Meerschweinchen No. 217 Tabelle XII b).

Aber auch das Urethan schützt in der größten möglichen Menge nicht gegen die doppelte tödliche Dosis. Allerdings konnten wir in einem Fall das Auftreten der Symptome ganz verhüten, in anderen trat der Strabismus auch hier auf, wenn auch die Zwangsbewegungen und Zwangsstellungen in der tiefen Dauernarkose ausblieben. Daß sie nur maskiert und nicht ausgeschaltet sind, zeigt das Verhalten der Chloroformtiere nach dem Erwachen aus der Narkose.

Alles in allem kommen wir also zu dem Schluß, daß ein sicherer Schutz gegenüber der karotal-zentralen giftigen Wirkung der Antisera durch die Narkose in nennenswertem Grade nicht erzielt wird.

4. Der Einfluß physikalischer und chemischer Veränderungen der giftigen Antisera auf ihre Wirkung bei karotal-zentraler Einspritzung.

a) Erhitzung.

Die wirksame Substanz des Antiserums ist relativ hitzebeständig. Erst bei einer Temperatur von 70° wird sie etwas abgeschwächt, bei 80° zerstört (siehe Tabelle XIII).

Tabelle XIII.

Alle Serumproben wurden $^1/_1$ mit physiolog. Kochsalzlösung verdünnt und $^1/_2$ Stunde im Wasserbad der in der Tabelle angegebenen Temperatur ausgesetzt, danach Injektion karotal-zentral (rechts). Dosis je 0,2 Serum No. 20.

Datum	Meer-schw. No.	Ge-wicht in g	Grad der Erhitzung $^1/_2$ Std.	Tod	Symptome
13. I. 21	63	200	60°	23′	Rollbewegung, Manège, Strabismus, Cornealreflex typisch
13. I. 21	66	200	65°	11′	Rollbeweg., Strab., Cornealrefl. typ.
13. I. 21	67	210	70°	in der Nacht	,, ,, ,, ,,
13. I. 21	68	230	80°	—	Keine Symptome

b) Trennung der Albumin- und Globulinfraktion.

Friedberger und Goretti[1]) haben die Tatsache mitgeteilt, daß, während bei den primär giftigen Antiseris bei der Dialyse und Ausfällung mit Kohlensäure der Ambozeptor im wesentlichen in den Niederschlag (Globulinfraktion) geht, sich die Globuline trotzdem als ungiftig erweisen, während die Albuminfraktion die Toxizität unverändert oder fast unverändert bewahrt. Diese Tatsache widerspricht der Theorie von Forssman über die Ursache der Giftigkeit der Antisera, sie ist aber mit der Theorie von Friedberger und Castelli[2]) wohl vereinbar.

Nach weiteren Untersuchungen von Friedberger, Schiff und Moore[3]) kommt auch die Fähigkeit, passiv zu präparieren, in Hammelseris nur der Albuminfraktion zu.

Es war also für die primär giftige Wirkung von der Carotis aus ein entsprechendes Verhalten zu erwarten. Tatsächlich entsprechen die Tatsachen, wie die nachstehende Tabelle zeigt, unseren Voraussetzungen.

Von Kaninchenserum No. 20, vorbehandelt mit Ziegenblut, wurden 5 ccm mit destilliertem Wasser gemischt und 48 Stunden gegen Leitungswasser in Fischblasenkondom dialysiert. In die trübe Flüssigkeit wurde Kohlensäure eingeleitet und noch weiterer Niederschlag erzielt. Der Globulinanteil wurde in physiologischer Kochsalzlösung entsprechend dem Volum des Serums gelöst. Der Albuminanteil wurde auf entsprechenden Salzgehalt gebracht und im Faustschen Apparat bei 37° auf sein ursprüngliches Serumvolum eingeengt. Auswertung der beiden Fraktionen am Meerschweinchen karotal-zentral.

Aus der nachstehenden Tabelle ergibt sich, daß auch bei karotal-zentraler Einspritzung die Giftigkeit im wesentlichen der Albuminfraktion eigen ist. Von ihr tötet mindestens die gleiche Dosis wie von dem Vollserum, während von der Globulinfraktion annähernd das 4-fache glatt vertragen wird.

Nur bei einem weiteren Versuch, in dem die Trennung

---

1) Friedberger und Goretti, Berlin. klin. Wochenschr., 1914, No. 17; diese Zeitschr., Bd. 21, 1914, S. 9.

2) Friedberger und Castelli, a. a. O.

3) Friedberger, Schiff und Moore, diese Zeitschr., Bd. 22, 1914, S. 609.

wohl weniger gut gelungen war, hat die doppelt tödliche Dosis des Globulins, allerdings auch erst nach nach längerer Zeit, getötet.

Tabelle XIV.

Auswertung der Fraktionen des Serums No. 20, Injektion karotal-zentral (rechts).

Datum	Meerschw. No.	Gewicht in g	Menge ber. auf urspr. Serum	Tod	Symptome
			A. Globulinfraktion		
24. XII. 20	33	180	0,2	—	Keine Symptome
22. XII. 20	31	160	1,0	—	ganz leichte Rollbewegung, Manègebew., nach 5′ erholt
24. XII. 20	37	320	2,0	—	Keine Symptome
			B. Albuminfraktion		
24. XII. 20	36	250	0,05	—	Rollbewegung, Manègebew., Strabismus, nach 30′ erholt.
24. XII. 20	35	180	0,1	26′	Rollbewegung, Manègebew., Strabismus, Kornealreflex erloschen
24. XII. 20	34	210	0,2	15′	Sofort Krampf und Parese
22. XII. 20	32	200	1,0	$1^1/_2{}^h$	Rollbewegung, Manègebew., Strabismus

Es ergibt sich also aus diesen Versuchen in Uebereinstimmung mit Friedberger und Goretti, Friedberger, Schiff und Moore, daß ebensogut wie bei der intravenösen Einspritzung das Prinzip der primären Antiserumgiftigkeit und ebenso wie das passive Präparierungsvermögen, auch die Giftwirkung bei intrakarotal-zentraler Einspritzung wesentlich in der Albuminfraktion enthalten ist. Die Tatsache, daß das Albumin beinahe noch stärker wirkt als das Vollserum, legte uns den Gedanken nahe, daß vielleicht das Globulin direkt einen gewissen hemmenden Einfluß ausübe. Wir haben deshalb noch Versuche mit Mischungen beider Bestandteile angestellt unter Verwendung eines Globulinüberschusses.

Eine Hemmung des Albumins durch das Globulin ist jedoch nicht eingetreten, wie das der folgende Versuch zeigt.

Es wurden von der Globulin-Albuminmischung, die auch zu dem Versuch der Tabelle XIV gedient hatte, Mischungen von Albumin und Globulin hergestellt, in denen die sicher oder doppelt tödliche Dosis von Albumin mit der 5-fachen

Menge (bezogen auf das ursprüngliche Serum) Globulin gemischt wurde. Injektion karotal-zentral (rechts).

Tabelle XV.

Datum	Meer-schw. No.	Ge-wicht in g	Mischung	Menge bezogen auf Serum	Tod	Symptome
13. I. 21	63	195	Globulin	1,0	11′	Sofort Rollbew., Cornealrefl.
			Albumin	0,2		r. erloschen
13. I. 21	64	210	Globulin	0,5	19′	Soforf Rollbew., Strabismus,
			Albumin	0,1		Cornealreflex r. erloschen

VI. Beziehungen der Serumgiftigkeit karotal-zentral zur Anaphylaxie.

1. Passive Uebertragung.

Bei den engen Beziehungen, wie sie von Friedberger und Castelli zwischen primärer Antiserumgiftigkeit bei der intravenösen Zufuhr und passivem Präparierungsvermögen festgestellt worden waren, lag es nahe, zu untersuchen, ob mit den karotal-zentral giftigen Seris vorbehandelte Meerschweinchen bei karotal-zentraler Reinjektion des homologen Antigens keine Ueberempfindlichkeit, sondern die typischen Phänomene nach Forssman zeigten. Zu diesem Zweck wurde ein Reihe von Meerschweinchen mit 0,5 bzw. 1,0 Kaninchen-Antiziegenserum No. 20 intraperitoneal vorbehandelt.

Nach 24 Stunden bzw. 48 Stunden wurde das homologe Normalziegenserum oder das ihm funktionell entsprechende Normalhammelserum karotal-zentral gegeben.

Wie die nachstehende Tabelle XVI zeigt, traten keine oder bei größeren Dosen nach 24 Stunden anaphylaxieähnliche Symptome auf. Allerdings bedingte die Reinjektion von 0,5 normalem Ziegenserum gewisse Symptome, die etwas an die typischen Forssmanschen erinnern, aber es überwog doch entschieden die Anaphylaxie, und diese beherrschte das Symptomenbild.

Da, wie wir noch zeigen werden, karotal-zentral auch Normalsera in größeren Dosen die typischen Gehirnsymptome auslösen können, so ist vielleicht die betreffende Komponente im Symptomenbild lediglich darauf zurückzuführen.

Tabelle XVI.

Tiere vor 24 Stunden (48 Stunden) mit 0,5 Antiziegenkaninchenserum No. 20 intraperitoneal vorbehandelt. Reinjektion von Normalziegen-(Hammel-)serum karotal-zentral und intravenös.

Datum	Meerschw. No.	Gewicht in g	Ort der Injektion	Zeitinterv. zw. Präp. u. Reinjekt.	Serum	Menge des Serums	Tod	Symptome
10. XII. 20	21	200	l. C.	24 Std.	Normal-Ziegen-S.	0,5	—	Keine Symptome
10. XII. 20	22	220	r. V.	24 „	dgl.	0,5	—	„ „
10. XII. 20	23	195	r. C.	24 „	Normal-Hammel-S.	0,5	—	„ „
10. XII. 20	24	180	r. C.	24 „	Normal-Ziegen-S.	0,75	6′	Allg. Anaphylaxie
14. XII. 20	27	170	r. C.	48 „	dgl.	0,5	in der Nacht	Keine Symptome
14. XII. 20	28	190	r. C.	48 „	„	0,75	—	„ „

Wir bringen im nachstehenden das ausführliche Protokoll des betreffenden Tieres (No. 24).

Meerschweinchen No. 24, 180 g, erhält am 10. XII. 20 0,5 ziegenhämolytisches Serum No. 20 intraperitoneal.

11. XII. 0,75 normales Ziegenserum in die rechte Carotis in 9 Sekunden, Tier schnuppert, anaphylaxieartige Krämpfe, rechts etwas Strabismus nach Nase, links nichts. Tier taumelt wie betrunken, fällt auf rechte Seite, strampelt mit allen Beinen, nach 5 Minuten Cornealreflex rechts erloschen, links erhalten. Kein Strabismus mehr, agonale Krämpfe durchaus vom Typus der Anaphylaxie. Nach 6 Minuten auch linker Cornealreflex erloschen, tot.

Sektionsbefund: Nebenniere blaß, Lunge gebläht, Herz kein Gerinnsel.

2. Aktive Anaphylaxie.

Forssman hat ganz allgemein gezeigt, daß bei einem mit irgendeinem Eiweiß präparierten Tier die Reinjektion des homologen Eiweißes in die Carotis zentralwärts lediglich das typische Symptomenbild der Ueberempfindlichkeit erzeugt, wobei auch quantitativ in den Dosen kein Unterschied besteht, indem die tödliche Dosis von der Vene und Carotis aus die gleiche ist.

Wir haben nun insofern eine Verbindung der aktiven Anaphylaxie mit der Wirkung der karotal-zentralen Einspritzung angestrebt, als wir Meerschweinchen aktiv mit Normalkaninchen-

serum präparierten und nach dem üblichen Inkubationsstadium nicht nur die tödliche Dosis des homologen Eiweißes an sich intrakarotal-zentral bestimmten, sondern im besonderen auch die eines hammelhämolytischen Kaninchenserums.

Am 19. I. 21 werden 15 Meerschweinchen mit 0,1 Kaninchenserum subkutan präpariert. Nach 18 Tagen wurde zunächst die tödliche Dosis Normalkaninchenserums karotal-zentral bestimmt. Sie betrug 0,75, dann wurde die Reinjektionsdosis an Stelle mit normalem Serum mit hammelhämolytischem Serum K. ermittelt. Zunächst wurde die sicher einfach tötende Dosis des Serums K. gegeben. Sie rief keine Symptome hervor (siehe Tabelle XVII).

Daraus ergibt sich, daß durch die Vorbehandlung mit Normalkaninchenserum jedenfalls keine erhöhte Empfindlichkeit für die karotal-zentral tödliche Dosis erreicht wird, ja man könnte an eine Herabsetzung der Empfindlichkeit denken, da in einem Versuch (No. 77) auch die doppelt tödliche Dosis bei der Reinjektion, bis auf ein vorübergehendes zeitweiliges Erlöschen des Cornealreflexes, gut vertragen wurde.

In einem weiteren Versuch traten bei der gleichen Dosis doch die typischen Symptome ein. Allerdings war das Tier nach 30 Minuten erholt. Das 4-fache Multiplum der tödlichen Dosis tötete unter den typischen Symptomen (No. 81) innerhalb einer Stunde.

Es ergibt sich also aus diesen Versuchen, daß bei mit Normalkaninchenserum präparierten Tieren, bei denen die tödliche Reinjektionsdosis von normalem Kaninchenserum karotal-zentral eine relativ hohe war, von einem giftigen Kaninchen-Immunserum karotal-zentral die tödliche Dosis nicht etwa gegenüber den Kontrollen verringert war, ja im Gegenteil, es schien vielleicht eine geringe Schutzwirkung durch die Präparierung erzielt worden zu sein.

Das trat jedoch in einer weiteren Versuchsreihe nicht hervor (s. Tab. XVII).

3. Bedingt die intrakarotale Vorspritzung einer untertödlichen Dosis des giftigen Antiserums in die Blutbahn einen Schutz gegen die tödliche Dosis?

Nach Forssman ist es nicht der Fall. Wir lassen einige Versuchsbeispiele folgen.

Tabelle XVII.
19 Tage vorher mit Normalkaninchenserum präparierte Meerschweinchen. Bestimmung der tödlichen Dosis. Normalkaninchenserum und hammelhämolytisches Kaninchenserum karotal-zentral und intravenös.

Datum	Meerschw. No.	Gewicht in g	Serum	Menge des Serums	Ort der Injektion	Tod	Symptome
7. II. 21	73	270	Normal-Kan.-Serum	0,02	r. C.	—	Keine Symptome
7. II. 21	74	285	dgl.	0,3	dgl.	—	Schlapp, Dyspnoë, erholt sich
7. II. 21	75	260	„	0,5	„	—	Keine Symptome
7. II. 21	86	250	„	0,75	„	5′	Sofort anaph. Krämpfe
7. II. 21	79	250	„	0,5	r. V.	5 Tag.	Keine Symptome
7. II. 21	82	160	hammelhäm. Kan.-Ser. K	0,05	r. C.	—	„ „
7. II. 21	76	260	dgl.	0,05	dgl.	—	„ „
7. II. 21	77	270	„	0,1	„	—	Cornealrefl. r. erloschen
7. II. 21	80	230	„	0,1	„	—	Typ. Symptome, nach 30′ erholt
7. II. 21	81	285	„	0,2	„	1h	Sofort typische Sympt

Tabelle XVIII.
Meerschweinchen vor 15 Tagen mit 0,1 Normalkaninchenserum intraperitoneal vorbehandelt.

Datum	Meerschw. No.	Gewicht in g	Serum	Dosis	Ort der Injektion	Tod	Bemerkung
17. I.	45	220	NKS.	0,01	r. C. c.		Keine Symptome
17. I.	39	250	dgl.	0,05	dgl.		„ „
11. I.	40	275	„	0,1	„		Leichte Zuckung
17. I.	44	235	„	0,3	„	5′	Typische Anaphylaxie
17. I.	43	255	„	0,1	r. V.		Keine Symptome
17. I.	41	245	„	0,2	dgl.		„ „
17. I.	42	250	„	0,3	„	6′	Typische Anaphylaxie
17. I.	46	245	No. 20	0,01	r. C. c.		Typ. Rollbew., erholt sich
17. I.	38	255	dgl.	0,05	dgl.	48h	Sof. typ. Rollb., Strabism. u. Manège, stirbt n. 48h

Aus ihnen ergibt es sich, daß in der Regel die Vorbehandlung mit dem giftigen Serum, sei es intravenös, ins Herz oder intrakarotal in Dosen, die zwischen 0,005 und 0,3 lagen, selbst wenn die Tiere schwere Vergiftungssymptome zeigten, nicht sicher gegen ein geringes Multiplum der tödlichen Dosis schützt.

Tabelle XIX.

Eine Reihe von Meerschweinchen, die karotal-zentral, intravenös oder ins Herz vorbehandelt waren, erhalten am nächsten Tag (in einem Fall erst nach 11 Tagen) dasselbe Serum karotal-zentral.

I. Injektion							II. Injektion					
Datum	Meerschw. No.	Gewicht in g	Serum	Dosis	Ort der I. Injektion	Symptome	nach Tagen	Serum	Dosis	Ort der II. Injektion	Tod	Symptome
3. I. 21	46	245	No.20	0,01	r. C.	Rollbewegung	1	No.20	0,1	r. C.	9'	Rollbeweg., Strab., Cornealreflex
3. I. 21	38	255	dgl.	0,05	r. C.	Rollbeweg., Manège, Strabismus, erholt	1	dgl.	0,1	l. C.	—	Keine deutl. Sympt.
3. I. 21	39	250	„	0,1	r. C.	dgl.	1	„	0,4	r. C.	—	dgl.
2.XII.20	2	260	No.59	0,005	l. C.	Keine Symptome	1	No.59	0,3	r. C.	in wenig. Min	Sofort Parese
8.XII.20	16	270	No.20	0,008	r. C.	„ „	11	No.20	0,15	l. C.	4'	Rollbewegung
30. I. 21	130	210	K	0,1	r. V.	Strabism., Corneal-reflex r. erloschen	1	K	0,05	r. C.	48^h	Rollbeweg., Strab.
5. II. 21	162	210	K	0,3	l.Herz	Keine Symptome	1	K	0,1	r. C.	6^h	Rollbeweg., Strab., Manège

Nur in einem Fall, in der das Tier (No. 39) mit der in der Regel tödlichen Dosis die schwere Vergiftung überstanden hatte, erwies sich sogar nachher die 4-fache Dosis als gänzlich unschädlich.

Daraus ergibt sich, daß doch entgegen den Forssmanschen Anschauungen, die auch wir anfangs bestätigen zu können glaubten, ein gewisser Schutz erzielt wird; allerdings nur offenbar bei der Vorbehandlung mit der an sich schon nahezu tödlichen Dosis in die Carotis. Wird dagegen die einfach tödliche Dosis oder selbst das 3-fache der tödlichen Dosis intravenös oder ins Herz vorgespritzt (Meerschweinchen 130, 162), so schützt diese Applikationsweise nach 24 Stunden nicht einmal sicher gegen die einfach tödliche Dosis.

4. Auslöschversuche.

Nach den voraufgegangenen Versuchen lag es nahe, auch zurKontrolle der vorliegenden und zu ihrer Deutung zu untersuchen, wie sich die Tiere nach vorheriger karotal-zentraler Einspritzung von Normalkaninchenserum gegenüber der nachfolgenden Applikation eines giftigen Antiserums zentral-karotal verhalten.

Bei der Anaphylaxie haben Friedberger und Hjelt[1]) festgestellt, daß es durch vorherige Einspritzung von Normalkaninchenserum gelingt, die aktive und passive Anaphylaxie „auszulöschen" (vgl. hierzu die Versuche von Weyl mit Antiseris). Haben wir etwas Aehnliches bei Einführung normalen Serums in die Blutbahn für die karotal-zentrale Wirkung zu erwarten? Die Dosen für die I. Behandlung konnten hier natürlich größer gewählt werden, als bei der Vorspritzung mit Kaninchenantiseris, bei denen sie im vorigen Versuch infolge der primären Giftigkeit beschränkt waren.

Am 5. XII. 20 erhielten eine Reihe von Meerschweinchen No. 6 und 7, No. 9—12 je 0,5 Kaninchenserum in die rechte Carotis oder rechte Vene. Am folgenden Tag wurde die einfache sicher akut tödliche Dosis oder mds. des giftigen Antiserums No. 59 intrakarotal-zentral gegeben.

In allen Fällen traten typische Symptome ein und subakuter Tod. Eine Auslöschung der giftigen Wirkung wird also durch die Vorbehandlung mit normalem Kaninchenserum unter den von uns gewählten Bedingungen nicht erzielt.

Tabelle XX.

Tödliche Dosis des Serums No. 59 bei vor 24 Stunden mit je 0,5 Normalkaninchenserum vorbehandelter Meerschweinchen (karotal-zentral und intravenös).

I. Behandlung (Normalkaninchenserum)				II. Behandlung nach 24 Stunden (Serum No. 59)			
Datum	Meerschw. No.	Gewicht in g	Ort der I. Injektion	Ort der II. Injektion	Menge des Serums 59	Tod	Symptome
5. XII. 20	6	215	r. C.	r. C.	Spur*)	4^h	Linksstellung, Strabismus
5. XII. 20	7	215	r. V.	r. C.	0,1	8^h	Typ. Rollbewegung und Manège
6. XII. 20	9	205	r. C.	l. C.	0,1	$4\frac{1}{2}^h$	Typische Manège
6. XII. 20	10	210	r. C.	r. C.	0,2	8^h	„ „
6. XII. 20	11	225	r. V.	r. C.	0,2	48^h	Typische Manège, Rollbewegung
6. XII. 20	12	215	r. V.	r. C.	0,3	5^h	Linksstellung, Strabismus

*) Teilweise verloren gegangen.

1) Friedberger und Hjelt s. bei Friedberger, Die Anaphylaxie in Kraus-Brugsch, Spezielle Pathologie und Therapie innerer Krankheiten, Bd. 2, Teil 1, Berlin-Wien 1919, S. 956.

5. Setzt eine Antianaphylaxie gegenüber Kanincheneiweiß bei präparierten Tieren die Giftigkeit des Antihammel-Kaninchenserums karotal-zentral herab?

Eine Reihe von Meerschweinchen wurde durch Injektion von 0,1 normalem Kaninchenserum intraperitoneal präpariert. Tödliche Dosis bei der Reinjektion nach 16 Tagen 0,1–0,3, sowohl von der Carotis wie von der Vene aus. (Gleiche Symptome, gleiche Sterbezeit.)

Wird nun die sicher tödliche Dosis bei derartig präparierten Tieren nach der Methode von Friedberger und Mita[1]) langsam intravenös gegeben und auf diese Weise eine Antianaphylaxie erzeugt, so besteht nach weiteren 24 Stunden zwar ein beträchtlicher Schutz gegen das normale Kaninchenserum als anaphylaktisches Antigen, nicht aber gegen das 4-fache Multiplum der zentral-karotal tödlichen Dosis vom Antihammel-Kaninchenserum. Ein Versuchsprotokoll mag zur Illustration dienen.

Meerschweinchen No. 47, 220 g, erhält am 3. I. 0,1 Normalkaninchenserum intraperitoneal. Nach 16 Tagen, am 18. I., wird die sicher tödliche Dosis 0,3 intravenös langsam in 10 Minuten injiziert. Leichte Symptome, Tier erholt sich bald. Nach 24 Stunden (19. I.) erhält das Tier 0,4 Serum Kaninchen No. 20 in 7 Sekunden zentral-karotal rechts. Sofort Rollbewegungen, rechtes Auge Strabismus nach Schädeldach, Cornealreflex erloschen, ebenfalls Lidreflex. Linkes Auge Lidreflex erhalten, Cornealreflex erloschen, nach 3 Minuten linkes Auge Corneal- und Lidreflex wieder da, nach 5 Minuten rechtes Auge ohne Lidschluß, infolgedessen Cornea opak trocken, nach 9 Minuten kein Tonus, Tier liegt auf der Seite, Kopftonus fehlt. Cornealreflex auch links jetzt gänzlich erloschen, nach 12 Minuten tot.

Offenbar ist zwar durch die langsame Reinjektion eine Antianaphylaxie gegen das Kanincheneiweiß erzeugt worden, nicht aber ein nennenswerter Schutz gegen die giftige Komponente des Antihammel-Kaninchenserums.

VII. Bindungsversuche.

Friedberger und Castelli[2]) haben bei der primären Antiserumgiftigkeit den Nachweis geliefert, daß bei der intravenösen Einspritzung die Giftwirkung nicht von dem Hämolysingehalt allein abhängig sein kann, da sie diesem nicht parallel

1) a. a. O.
2) a. a. O.

geht. Für die heterogenetischen Antisera haben das gleiche Friedberger und Goretti[1]) gezeigt. Das gilt sogar für ein und dasselbe Antiserum in den einzelnen Phasen der Entnahme vom Tier. Weiterhin wurde gezeigt, daß bei Erwärmung inaktiver isogenetischer und heterogenetischer Sera auf 65° zunächst der Ambozeptor eine stärkere Abnahme erleidet als die Giftigkeit.

Vor allen Dingen liefern aber die oben erwähnten Dialyse- und Ausfällungsversuche mit Kohlensäure den Beweis, daß der Ambozeptor nicht für die giftige Wirkung allein verantwortlich ist, denn bei der Dialyse und Ausfällung mit Kohlensäure geht der Ambozeptor, wie wir wissen, im wesentlichen in den Niederschlag (Globulinfraktion). Trotzdem erweisen sich die Globuline als ungiftig, während die Albuminfraktion die Toxizität unverändert oder fast unverändert bewahrt.

Diese Tatsachen widersprechen, wie schon oben bemerkt, der Anschauung von Forssman, daß im Antikörper die Ursache der Giftigkeit allein zu suchen ist. Sie sind aber wohl mit der Theorie von Friedberger und Castelli vereinbar, wonach die Giftigkeit auf den gleichzeitigen Gehalt der Antisera an Antikörper und einer zweiten Komponente beruht, als welche die Autoren, zunächst freilich hypothetisch, bis zu einem gewissen Grade abgebaute Antigenreste im Antiserum verantwortlich gemacht haben.

Die teilweise Abhängigkeit der Giftigkeit vom Antikörper ergab sich aus der auch von Friedberger und Castelli festgestellten Tatsache, daß Ausfällung des Antikörpers mit dem homologen Antigen dem Serum mit dem Antikörper zugleich die Giftigkeit raubt.

Daß nun auch bei der karotal-zentralen Wirkung die Giftigkeit dem Antikörpergehalt nicht parallel geht, ergibt sich schon aus der Uebersichtstabelle IV, wo z. B. bei gleichem hämolytischen Titer (0,0004) die Giftigkeit zwischen 0,07 und 0,3 schwankte, und wiederum ein hämolytisches, um 50 Proz. schwächeres Serum (K) den höchsten Giftwert (0,05) zeigte.

Immerhin war in Analogie der vorerwähnten Ausfällungsversuche von Friedberger und Castelli zu erwarten, daß

---

1) a. a. O.

auch hier durch Behandlung mit entsprechendem Antigen die Sera ihre Giftigkeit verlieren würden.

Forssman hat das schon durch Adsorption mit Meerschweinchenniere nachgewiesen.

1. Bindungen an Blutkörperchen.

Entsprechend dem Vorkommen der isogenetischen und heterogenetischen Antigene für Hammelblut mußte auch eine Ausfällung mit Hammel- bzw. Ziegenblut, nicht aber mit Menschen- und Rinderblut gelingen.

Vom Serum Kaninchen No. 20 wurden 4 ccm mit den Blutkörperchen aus 1 ccm gewaschenem Vollblut (auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt) 1 Stunde bei 37° gehalten und zentrifugiert. Die Ausfällung wurde noch einmal wiederholt, dann wurden die Abgüsse zunächst auf ihren Hämolysingehalt austitriert unter Zusatz von 0,1 Komplement.

Der ursprüngliche Titer des Serums für Hammelblut 0,0004,
nach der Ausfällung mit Ziegenblut 0,006,
nach der Ausfällung mit Menschenblut 0,0016,
nach der Ausfällung mit Rinderblut 0,004.

Die Giftigkeit der mit einzelnen Blutarten ausgefällten Quoten des Serums zeigt die nachstehende Tabelle.

Tabelle XXI.

Injektion der ausgefällten Sera karotal-zentral rechts. (In der Rubrik „Menge" beziehen sich die angegebenen Zahlen auf die tatsächliche Serummenge.)

Datum	Meerschw. No.	Gewicht in g	Menge des Antiser.	Tod	Symptome
			Ausfällung mit Ziegenblut		
16. I. 21	69	220	0,1	—	Keine Symptome
16. I. 21	71	250	0,3	—	„ „
			Ausfällung mit Menschenblut		
16. I. 21	70	230	0,1	15'	Rollbewegung, Strabismus, Cornealreflex erloschen
			Ausfällung mit Rinderblut		
22. I. 21	92	185	0,05	40'	Rollbewegung, Strabismus, Cornealreflex erloschen
22. I. 21	101	160	0,1	$1^1/_4{}^h$	Rollbewegung, Manège, Strabismus, Cornealreflex erloschen

Aus der Tabelle XXI ergibt sich, daß nach Ausfällung mit Ziegenblut ein Multiplum der sonst sicher tödliche Dosis

karotal-zentral anstandslos vertragen wird, während nach Ausfällung mit Rinderblut und Menschenblut die Giftigkeit auch nicht im geringsten abgenommen hat.

2. Ausfällungsversuch mit Meerschweinchengehirn und Kaninchengehirn.

Nach dem ganzen Symptomenkomplex war in vivo beim Meerschweinchen in erster Linie eine Bindung des giftigen Antikörpers an die Gehirnsubstanz zu erwarten, und zwar wiederum an das Gehirn von Tieren des Meerschweinchentypus, nicht aber des Kaninchentypus.

Es wurden 1 g Gehirnsubstanz vom Meerschweinchen (zu gleichen Teilen Kleinhirn, Medulla oblongata, sowie Großhirn) mit 4,0 physiol. Kochsalzlösung fein emulgiert, dazu 2,0 ziegenhämolytisches Serum No. 20 gegeben, 1 Stunde Brutschrank, dann zentrifugiert. Der Abguß wurde auf Giftigkeit geprüft.

Die Mengen in nachstehenden Versuchen sind wieder auf die darin enthaltenen Serummengen berechnet.

Meerschweinchen No. 57, 400 g, erhält am 7. I. 21 0,1 des ausgefällten Serums in die rechte Carotis, nach 1 Minute Sprünge anaphylaktischer Natur, teilweise auch Manègebewegungen gegen den Uhrzeiger, aber mehr unter Krämpfen, wie bei Anaphylaxie, kein Strabismus. Zunächst keine Störung des Cornealreflexes, tot in 10 Minuten, typische Lungenblähungen.

Meerschweinchen No. 58, 400 g, erhält am 7. I. 21 rechts karotalzentral 0,06 desselben Abgusses, keine Symptome.

Es ergibt sich aus diesem Versuch, daß das Meerschweinchengehirn die sicher tödliche Dosis des Giftes bindet, das die Gleichgewichts- usw. Störungen verursacht, nicht aber die Anaphylaxie erzeugende Komponente. Ob das für zwei verschiedene Gifte im Antiserum spricht oder ob nur quantitative Differenzen hier in Frage kommen, muß zunächst dahingestellt bleiben.

Der Versuch wurde mehrmals wiederholt, in Parallelreihe auch mit Kaninchengehirn.

Gleichzeitig wurde auch normales Kaninchenserum mit beiden Gehirnarten ausgefällt, um eine eventuelle Organextraktwirkung ausschließen zu können. Das Ergebnis eines solchen Versuches zeigt die Tabelle XXII.

Aus der Tabelle XXII ergibt sich, daß, mit Kaninchengehirn ausgefällt, das Kaninchenantiserum seine Giftigkeit, der

Tabelle XXII.

Serum K bzw. Normalkaninchenserum wird in analoger Weise wie oben mit Kaninchen- bzw. Meerschweinchengehirn ausgefällt. Die Abgüsse werden am Meerschweinchen auf Giftigkeit ausgewertet. (Die Zahlen in der Tabelle beziehen sich auf die absolute Serummenge.)

Datum	Meer-schw. No.	Ge-wicht in g	Ort der Injekt.	Menge des Serums	Tod	Symptome
			A. Serum „K“, ausgefällt mit Kaninchengehirn.			
3. II. 21	135	250	l. C.	0,033	in der Nacht	Keine Symptome
4. II. 21	159	200	dgl.	0,05	—	Sofort etwas typische Symptome; erholt sich bald
4. II. 21	160	220	„	0,0667	—	Nur Konvexität r., Kopf nach l. torquiert
5. II. 21	167	220	„	0,133	—	Keine Symptome
			B. Kontrolle: Normalkaninchenserum, ausgefällt mit Kaninchengehirn.			
11. II. 21	180	160	r. C.	0,2	—	Keine Symptome
			C. Serum „K“, ausgefällt mit Meerschweinchengehirn.			
6. II. 21	173	180	r. C.	0,1	—	Keine Symptome
6. II. 21	174	170	„	0,2	—	„ „
6. II. 21	175	150	„	0,5	—	„ „
			D. Normalkaninchenserum, mit Meerschweinchengehirn ausgefällt			
6. II. 21	176	150	r. C.	0,5	2h	Keine Symptome

Voraussetzung entgegen, keineswegs völlig bewahrt hat. Es hat offenbar auch durch das Kaninchengehirn eine geringe Bindung stattgefunden, in dem die tödliche Dosis (Meerschweinchen No. 167) keine Symptome hervorrief. In einem anderen Versuch (No. 159) hat allerdings auch noch eine kleine Dosis typische Symptome für kurze Zeit bewirkt, die aber bald zurückgingen. Das mit Kaninchengehirn ausgefällte Normalserum war auch in größerer Dosis (0,2) unwirksam.

Bei Ausfällung mit Meerschweinchengehirn ist die Giftigkeit natürlich noch mehr geschwunden. Auch hier rief das mit Gehirn ausgefällte Normalkaninchenserum keine Symptome hervor.

Die Tatsache, daß nicht nur das Meerschweinchengehirn, sondern unerwarteterweise auch das Kaninchengehirn das Gift etwas bindet, findet vielleicht in weiter unten zu besprechenden Versuchen am lebenden Tier eine Aufklärung.

3. Bindungsversuch mit überlebender Lunge.

Wir haben nun weiterhin in Erfahrung zu bringen gesucht, ob auch überlebende Organe vom Meerschweinchentypus, ebenso wie Zellemulsionen das Gift binden.

Da von der Carotis aus tödliche Dosen des Giftes in anderen Gefäßbezirken ungiftig waren, so wurde, abgesehen von der schon diskutierten Erklärung, daß durch die besonderen Gefäßverhältnisse von der Carotis aus das giftige Serum direkt ins Kleinhirn gelange, auch die Möglichkeit erörtert, daß vielleicht unter anderen Injektionsbedingungen in die Gefäßbahn das Serum in der Lunge entgiftet werde. Die Lunge des Meerschweinchens ist ja ähnlich wie die Niere besonders reich an heterogenetischem Antigen, das den Antikörper hätte binden können.

Wir haben, von derartigen Vorstellungen ausgehend, folgenden Versuch[1]) angestellt.

Die eine Lungenhälfte eines großen Meerschweinchens von 700 g wurde am 18. II. 21 von der Arteria pulmonalis mit körperwarmer Ringerlösung durchblutet, dann wurde in den Kanülenschlauch 3,75 Serum Sch. injiziert und 15 ccm Flüssigkeit danach aufgefangen. 1 ccm enthielt also maximal 0,25 Serum.

18. II. 21. Meerschweinchen No. 196, 245 g, erhält 0,2 ccm = 0,05 bis 0,075 Serum rechts karotal-zentral. Typische schwere Symptome.

Die am gleichen Tage nochmals ermittelte tödliche Dosis des Serums Sch. betrug bei einem 250 g schweren Tiere 0,075. Das Serum hat also an Giftigkeit durch die Lungenpassage jedenfalls nicht abgenommen. Die Hälfte des durchgelaufenen Serums, 7,5 Volumen, wurde nochmals durch die Lunge geschickt und 25 ccm Ringerlösung gesammelt. 25 ccm = 1,9 Serum, 1 ccm = 0,076.

18. II. 21. Meerschweinchen No. 198, 260 g, erhält 0.7 ccm = 0,05 Serum Sch. rechts karotal-zentral. Typische Symptome, überlebt.

Kontrolltier No. 199, 250 g, erhält 0,05 des gleichen nativen Serums ebenso. Typische Symptome, überlebt.

Es hat also auch bei der zweimaligen Durchströmung durch die Lunge eine nachweisbare Abnahme der Giftigkeit

---

1) Dieser Versuch wurde im Physiologischen Institut ausgeführt. Herrn Privatdozent Dr. Atzler danken wir für die Hilfe.

nicht stattgefunden. Die Intaktheit des Lungenpräparates ergab die nachherige Durchströmung mit Eosinlösung.

VIII. Giftigkeit anderer Sera bei karotal-zentraler Einspritzung.

1. Immunsera.

Bisher wurde nur die Giftigkeit des hammelhämolytischen Kaninchenserums untersucht, sei es daß es sich um ein isogenetisches mit Hammel- oder Ziegenblut erzeugtes, sei es daß es sich um ein heterogenetisches (Meerschweinchenniere) oder mit gekochtem Hammelblut erzeugtes handelte.

Nach Forssmans Anschauung ist es ja der heterogenetische Anteil des Hammelhämolysins, der vermöge seiner Affinität zu Meerschweincheneiweiß sowohl die anaphylaktischen Symptome bei intravenöser Zufuhr als auch die Gehirnerscheinungen bei karotal-zentraler Zufuhr bedingt. (Er ist freilich geneigt, die Giftkomponente, die bei der karotalzentralen Zufuhr wirkt, für verschieden von der intravenös wirksamen zu halten.)

Die Bindungsversuche, namentlich die mit Blutkörperchen, scheinen zunächst für die Richtigkeit der Forssmanschen Anschauung zu sprechen, daß bei beiden Vergiftungsarten das Symptomenbild durch die Affinitätsbeziehungen zwischen Hammelhämolysin und heterogenetischem Antigen zustande kommt. Dann müßten andere Antisera, die kein heterogenetisches Hammelhämolysin enthalten, unwirksam sein. Schon Friedberger und Castelli haben aber gezeigt, daß keineswegs nur diejenigen Kaninchenantisera giftig sind, die heterogenetische Anteile enthalten (z. B. auch manche Typhus-Antisera). Ebenso müßten normale Sera und Eiweißgifte unwirksam sein.

Unsere Aufgabe war deshalb, weiterhin zu prüfen, wie weit bei der karotal-zentralen Einspritzung eine Wirkung ausschließlich dem (heterogenetischen) Kaninchen-Hammelhämolysin zukommt. Zunächst haben wir ein beim Meerschweinchen durch Hammelblutinjektion gewonnenes Serum untersucht.

Ein großes Meerschweinchen wurde durch dreimalige Injektion von Hammelvollblut in die Vena jugularis dextra in zweitägigen Intervallen vorbehandelt. 8 Tage nach der letzten Behandlung wurde Blut entnommen Titer 0,0004).

Das Serum war also zufällig hämolytisch genau so wirksam, wie die Mehrzahl der beim Kaninchen von uns gewonnenen Sera. Doch war es bei karotal-zentraler Einspritzung in Dosis von 0,3 völlig ungiftig (Meerschweinchen No. 166, 220 g, 0,3 rechts karotal-zentral). Das stimmt mit den Forssmanschen Voraussetzungen durchaus überein, denn ein Hammelhämolysin beim Meerschweinchen gewonnen, konnte auf Grund der herrschenden Vorstellungen für diese Spezies nicht giftig sein.

Wir haben dann eine Reihe weiterer, und zwar präzipitierende Antieiweißsera geprüft. Ihr hämolytischer Titer, sowie ihre Giftigkeit bei karotal-zentraler Einspritzung sind in der nachstehenden Tabelle zusammengestellt. Sie alle enthalten keine oder nur geringe Mengen Hämolysin für Hammelblut. Dementsprechend sehen wir auch, daß unser Antimenschen-, Antirinder- und Antischweineserum nicht karotal-zentral unter typischen Symptomen giftig waren, obwohl das Antirinderserum noch eine ziemliche Menge von Hämolysin gegen Hammelblut enthielt.

Tabelle XXIII.
Versuch mit verschiedenen Antiseris. Dosis je 1,0 karotal-zentral r.

Datum	No.	Gewicht in g	Serum	Titer Hämolyse für Ha.-Bl.	Tod	Symptome
3. II. 21	134	270	Antirinder-Kanin.-Ser.	0,04		Keine Symptome
3. II. 21	135	220	Antipferde-Kanin.-Ser.	0,06		„ „
3. II. 21	136	240	Antihunde-Kanin.-Ser.	0,08	24h	Nach 10′ typische Manège geg. Uhrz. r. Cornealrefl. träg, Konv. r., erholt
3. II. 21	137	260	Antimensch.-Kanin.-Ser.	0,01		Keine Symptome
3. II. 21	138	210	Antihuhn-Kanin.-Ser.	> 0,4		Sofort Rollbeweg., Strabismus, Manège gegen Uhrz., r. beid. Reflexe erlosch., Konvexität r., erholt
3. II. 21	139	260	Antitauben-Kanin.-Ser.	> 0,4		Typische Konvexität r., r. Cornealrefl. erlosch., nach 30′ typ. Manège gegen Uhrzeiger, erholt
3. II. 21	140	220	Antischw.-Kanin.-Ser.	> 0,4		Keine Symptome
3. II. 21	150	200	Antiziegen-Kanin.-Ser.	0,08 agglut.		„ „

Aber ihre Ungiftigkeit erklärt sich auch nach der herrschenden Vorstellung daraus, daß es sich hier um Antisera handelt, die nicht gegen den Meerschweinchentypus, sondern gegen den Kaninchentypus gerichtet sind. Schon eher hätte man eine Giftigkeit beim Antipferde- und Antiziegenserum erwarten können, von denen das erstere auch Hammelhämolysin enthält, da es sich hier um Antikörper handelt, die auf Eiweiß vom Meerschweinchentypus eingestellt sind. Aber auch diese Sera erwiesen sich entgegen der Erwartung als ungiftig, und nur das Antihundeeiweißserum und das Antihühnereiweißserum zeigten eine gewisse Giftigkeit.

Wir möchten sie nicht ohne weiteres mit dem heterogenetischen Antikörper in Beziehung bringen, denn das Antihühnerserum enthält überhaupt kein Hammelhämolysin. Das Antihundeserum hatte freilich einen Titer von 0,08.

Auch das Antitaubenserum bedingte typische Symptome, obwohl es weder Hammelhämolysin enthält noch auf den Meerschweinchentypus eingestellt ist. Die Organe der Taube bilden und binden Hammelhämolysin nicht[1].

Wegen der theoretischen Wichtigkeit dieser Versuche mögen die Protokolle der betreffenden Tiere hier noch einmal gedrängt kurz aufgeführt werden.

3. II. 21. Meerschweinchen No. 136, 240 g, erhält in die rechte Carotis 1,0 Antihundeserum in 10 Sekunden. Nach 10 Minuten Manègebewegungen gegen Uhrzeiger, Körper typisch nach links zusammengeklappt, rechts Cornealreflex träge, links erhalten. Nach 12 Minuten erneute Manègebewegungen gegen Uhrzeiger, nach $^1/_2$ Stunde erholt.

3. II. 21. Meerschweinchen No. 138, 210 g, erhält rechts karotalzentral 1,0 ccm Antihühnerserum in 10 Sekunden. Sofort typische Rollbewegungen, Strabismus rechts nach Nasenspitze, links nach Schädeldach. Corneal- und Lidreflex rechts erloschen, nach 5 Minuten Tier erholt, Reflexe kehren wieder, typische Stellung des Vorderkörpers, sehr starke Konvexität rechts, nach 8 Minuten Manègebewegungen gegen den Uhrzeiger, Tier erholt sich bald.

3. II. 21. Meerschweinchen No. 139, 260 g, erhält rechts karotalzentral 1,0 ccm Antitaubenserum in 7 Sekunden, sofort typische Stellung des Vorderkörpers, starke Rechtskonvexität, Cornealreflex rechts erloschen, links erhalten, Strabismus rechts nach Nasenspitze, links nach Schädeldach nur angedeutet, Tier ist vollständig schlapp, typische Kreuzung der Vorder-

1) Siehe Friedberger, Anaphylaxie, Kraus-Brugsch, Pathologie, Bd. 2, p. 899.

beine, nach 4 Minuten vollständige Parese. Nach 15 Minuten ist das Tier wieder erholt, Reflexe wieder vorhanden, nach 30 Minuten typische Manègebewegung und Körperstellung, hie und da leichte Zuckungen, Tier erholt sich wieder.

Namentlich der Versuch mit dem Antitaubenserum, aber auch der negative mit dem Antipferdeserum zeigen erneut, daß sich die Giftigkeit nicht restlos auf der Grundlage der heterogenetischen Antikörper erklären läßt.

2. Normalsera.

Da wir bei den vorstehenden Versuchen von vornherein ziemlich große Mengen von Kaninchenserum gegeben hatten, so mußten wir zunächst in Kontrollen, die bei der intravenösen Injektion schon bekannte Tatsache, auch hier erneut festlegen, daß in entsprechenden Dosen normales Kaninchenserum ungiftig ist.

Tatsächlich haben wir keinerlei Symptome bei 1,0 ccm Normalkaninchenserum gesehen, ebensowenig wie bei den meisten der Antisera der vorstehenden Tabelle.

Dagegen ergaben Dosen über 1,5 normalen Kaninchenserums zu unserer größten Ueberraschung das typische Bild, wie wir es sonst in der Regel nur bei kleinen Dosen von hammelhämolytischem Kaninchenchenserum sahen. Nachstehend ein Protokoll:

4. II. 21. Meerschweinchen No. 159, 230 g, erhält rechts karotalzentral 1,7 ccm inaktives normales Kaninchenserum (hämolytischer Titer $> 0{,}1$) in 35 Sekunden.

Sofort typischer Strabismus, Korneal- und Lidreflex rechts erloschen, links erhalten. Intensive Rollbewegungen, danach typische Körperstellung, dann Manègebewegung gegen Uhrzeiger, nach 5 Minuten ist das Tier ruhig und zeigt nur sehr starken Strabismus, der Cornealreflex kehrt rechts wieder, ebenso der Lidreflex, noch vereinzelte Zuckungen, dann Erholung.

Bekanntlich ist das normale Rinderserum für das Meerschweinchen besonders giftig. Es lag daher nahe, mit Rinderserum entsprechende Versuche anzustellen, vor allen Dingen aber auch mit dem ungemein giftigen Aalserum. Wir haben frisches und inaktiviertes Rinderserum intrakarotal und intravenös gespritzt und die tödliche Dosis bei beiden Infektionsmodi ermittelt.

Tabelle XXIV.

Giftigkeit des normalen Rinderserums karotal-zentral r. und iv.

Datum	Meerschw. No.	Gewicht in g	Ort der Injektion	Serum	Menge des Serums	Tod	Symptome
26. I. 21	109	230	r. C.	aktives Norm.-Rinderserum	0,3	—	Keine Symptome
26. I. 21	108	220	dgl.	dgl.	0,5	50′	Rollbeweg. Strabism., r. Cornealreflex erloschen
26. I. 21	110	240	r. V.	„	0,7	—	Keine Symptome
26. I. 21	106	235	r. C.	„	1,0	7′	Manège. Strabism., r. Cornealreflex erloschen
26. I. 21	107	240	r. V.	„	1,0	6′	Anaphyl. Krämpfe
27. I. 21	118	240	r. C.	56° inaktiv. N.-Rinderserum	0,7	—	Keine Symptome
27. I. 21	119	210	dgl.	dgl.	1,0	5ʰ	Manège. Strabism., r. Cornealreflex erloschen
27. I. 21	122	210	„	65° erh. Norm.-Rinderserum	1,0	—	Keine Symptome

Es ergibt sich, daß 0,5 ccm Normalrinderserum zentralkarotal unter den typischen Symptomen tötet, während von der Vene erst die doppelte Dosis tödlich wirkt. Nach dem Inaktivieren bei 56° (30 Minuten) sinkt die Giftigkeit um etwa 100 Proz. Bei Erhitzen auf 65° wird das giftige Prinzip weiter zerstört, während es sich im Antihammel-Kaninchenserum (siehe oben p. 79) als thermostabiler erwies. Der hämolytische Titer des hier verwendeten Rinderserums betrug für Hammelblut > 0,4.

Versuch mit Aalserum: Wir benutzten frisches vom lebenden Fisch entnommenes Blut. Das Serum wurde durch Zentrifugieren gewonnen. Die tödliche Dosis von der Carotis und Vene aus zeigt Tabelle XXV.

Auch hier sehen wir die Tatsache, daß genau so wie die giftigen Antisera auch das normale Aalserum von der Carotis aus giftiger wirkt, wie von der Vene aus.

Die Symptome von der Carotis aus waren dieselben, wie bei den giftigen Antihammelseris, während sich von der Vene aus keine Anaphylaxie, sondern nur Lähmungserscheinungen geltend machten.

Tabelle XXV.
Bestimmung der Giftigkeit des Aalserums.

Datum	No.	Gewicht	Serum	Menge	Ort	Tod	Symptome
				1. karotal-zentral.			
9. II. 21	117	200	Aalserum	0,0005	l. C.		Keine Symptome
9. II. 21	158	215	„	0,002	dgl.		dgl.
9. II. 21	140	220	„	0,005	„		Manège geg. Uhrz., Cornealreflex träg, erholt sich
9. II. 21	136	220	„	0,007	„	$4^1/_2{}^h$	Sofort Rollbewegung, Strabism. beiders. deutlich
9. II. 21	132	210	„	0,01	„	1^h	Sofort schlapp, Strabism., r. Cornealreflex erloschen
5. II. 21	164	210	„	0,05	r. C.	1′	Sofort schlapp
				2. intravenös.			
11. II. 21	154	250	Aalserum	0,005	l. V.		Keine Symptome
11. II. 21	76	260	„	0,007	dgl.		dgl.
11. II. 21	78	240	„	0,01	r. V.	6′	Sofort schlapp
11. II. 21	98	225	„	0,02	dgl.	10′	dgl.

Weiterhin wurde nun ein Schlangengift nach der gleichen Richtung hin untersucht und zwar ein Cobratrockengift, das mir 1913 von Herrn Professor Calmette in Lille überlassen worden war. Von diesem Gift wurde eine wässerige Lösung hergestellt und die akut tödliche Dosis karotal und intravenös bestimmt. 0,00005 ist die von der Carotis aus tödliche Dosis. Doch sind die Symptome von der bei der Antiserumeinspritzung wesentlich verschieden. Es macht sich in erster Linie die Curarewirkung geltend.

11. II. 21. Meerschweinchen No. 173, 170 g, erhält 0,00005 Schlangengift karotal-zentral in 6 Sekunden. Keinerlei typische Symptome, wohl aber ist der Kornealreflex rechts erloschen, unter Erhaltung links. Tot nach 30 Minuten unter allmählich fortschreitender Parese. Obduktionsbefund: Lunge hyperämisch, gebläht, Herz schlägt noch.

Erst größere Dosen (0,001), allerdings auch bei 100 g schwererem Tier, tötete unter den typischen Symptomen.

11. II. 21. Meerschweinchen No. 165, 270 g, erhält 0,001 Cobragift links karotal in 5 Sekunden. Sofort Cornealreflex rechts erloschen, typische Rollbewegungen, Tier ist danach vollkommen schlapp und nach 5 Minuten tot. Obduktionsbefund: Lunge gebläht, hyperämisch, zahlreiche hämorrhagische Flecken.

11. II. 21. Meerschweinchen No. 218, 290 g, erhält gleichfalls 0,001 Schlangengift rechts karotal in 4 Sekunden. Das Tier ist sofort tot.

Offenbar vermag nicht immer, wohl wegen der Lähmungskomponente des Giftes, die typische karotal-zentrale Wirkung hervorzutreten. Die kleinste lähmende Dosis ist anscheinend geringer. Sie betrug von unserem Gift 0,00005, eine Dosis, die für typische karotal-zentrale Wirkung wohl noch nicht ausreicht. Diese liegt wohl bei etwa 0,001, kann aber nur dann in Erscheinung treten, wenn bei dieser Dosis der Lähmungstod nicht vorzeitig eintritt. Von der Vene aus ist bei diesen Versuchen die unter Lähmung tödliche Dosis etwa die gleiche, wie karotal-zentral. Vielleicht ist die Wirkung von der Vene aus etwas verzögert.

Tabelle XXVI.

Versuch mit Schlangengift.

Datum	Meerschw. No.	Gewicht in g	Serum	Menge	Ort und Meth.	Tod	Symptome
11. II. 21	M. 161	210	Cobragift	0,000001	l. C.		keine Sympt.
dgl.	M. 91	160	„	0,00001	„		„ „
„	M. 173	170	„	0,00005	„	36′	r. C.-refl. erl., Lähmungst.
„	M. 180	160	„	0,0001	„	20′	Lähmungstod
„	M. Noverl.	245	„	0,0002	„	dieselbe Nacht	keine Sympt.
25. II. 21	M. 165	270	„	0,001	„	5′	sof. Roll., r. C.-refl. erl. Kein Strab.
dgl.	M. 213	150	„	0,00005	r. C.	1h 10′	
„	M. 193	120	„	0,00003	l. C.	i. d. Nacht	
„	M. 218	290	„	0,001	r. C.	sofort	
„	M. 194	165	Cobragift	0,00005	iv.	i. d. Nacht	
„	M. 208	170	„	0,0001	„	20′	

Aus den voraufgegangenen Versuchen ergibt sich, daß die typischen Symptome bei der karotal-zentralen Einspritzung nicht nur durch heterogenetische, sondern auch durch andere Antisera, ja sogar durch Normalsera und giftiges Eiweiß überhaupt, wie Schlangengift, hervorgerufen werden können.

IX. Ueber die Wirkung chemischer Gifte karotal-zentral.

Die nächstliegende Frage war nun die: „Wirken chemisch definierte giftige Substanzen karotal-zentral nicht ähnlich wie giftiges tierisches Eiweiß (Sera und Toxine)?"

Zunächst wurde derjenige Körper geprüft, bei dem enge Beziehungen zur Anaphylaxie immer wieder namentlich von englischen und amerikanischen [1]) Autoren behauptet wurden. Es ist das β-Imidazolyläthylamin (Histamin). Neuerdings erst wieder hat Dale [2]) derartige Zusammenhänge angenommen, ohne die bereits seit vielen Jahren vorliegenden Versuche von Friedberger und A. Moreschi [3]) zu berücksichtigen, wonach wesentliche Unterschiede zwischen Histamin und Anaphylatoxin bestehen.

Das β-Imidazolyläthylamin ist hitzebeständig, das Anaphylatoxin nur bei saurer Reaktion. Gegenüber Alkali ist es im Gegensatz zu Histamin außerordentlich empfindlich, während das Histamin auch hier beständig ist. Weitere Unterschiede sind von Smith [4]) angegeben: Histamin beeinflußt nicht wie das Anaphylatoxin die Temperatur, die Gerinnung des Blutes und nicht wie das Chinin bei der Anaphylaxie die Vergiftung. Ferner besteht keine Beziehung zwischen Histamin und Antianaphylaxie.

Tabelle XXVII.

Versuch mit β-Imidazolyläthylamin karotal-zentral (links).

Datum	Meer-schw. No.	Gewicht in g	Dosis des β-Imid.	Tod	Symptome
18. II.	197	250	0,1 mg		Tier taumelt, erholt sich
19. II.	170	170	0,15 „	2'	Krämpfe (anaph.)
18. II.	185	160	0,2 „	2'	„ „
„	No. verl.	300	0,5 „	2'	„ „
„	181	200	1,0 „	sofort	„ „

1) Paul, John, Bull. of the Johns Hopkins Hosp., Vol. 32, 1921, No. 359, p. 20—21.

2) H. H. Dale, Bull. of Johns Hopkins Hosp., Vol. 31, 1920, No. 355, p. 310—319.

3) Friedberger und Moreschi, Berl. klin. Wochenschr., 1912, No. 16.

4) Maurice Smith, Journ. of immunulog., Vol. 5, 1920, No. 3, p. 239—257.

Immerhin erschien es uns interessant, die Giftigkeit dieser Substanz bei karotal-zentraler Zufuhr zu untersuchen[1]).

Wie sich aus der nachstehenden Tabelle ergibt, liegt die tödliche Dosis bei 0,2—0,1 mg.

Irgendwelche Symptome, die an die bei karotal-zentraler Einspritzung giftigen Serums erinnern, traten nicht auf. Wir haben deshalb auf Versuche von der Vene aus verzichtet.

Ebensowenig zeigten Tiere, die die tödliche Dosis von Strychnin erhielten, irgendwelche entsprechende Symptome.

Auch Koffein wirkte in größeren Dosen karotal-zentral nur Krämpfe erzeugend.

Tabelle XXVIII.

Datum	Meer-schw. No.	Gewicht in g	Menge	Ort	Tod	Symptome
Versuch mit Strychnin karotal-zentral.						
16. II.	181	210	0,000001	r. C.	—	Keine typischen Symptome
„	185	180	0,0000012	„	484	
„	No. verl.	300	0,0000025	l. C.	—	
„	82	160	0,000005	„	—	
„	128	310	0,00001	„	sofort	Krämpfe
„	73	275	0,0001	„	„	
Versuche mit Koffein karotal-zentral						
16. II.	75	270	0,01			Keine Symptome
„	82	270	0,02			Nur Krämpfe

X. Ueber die Angriffsstelle des giftigen Serums bei karotal-zentraler Einspritzung.

Forssman hat angenommen, daß die Giftwirkung durch Verankerung am Kleinhirn zustande käme, und er hat dies aus den typischen Symptomen geschlossen.

---

1) Wir verdanken das Präparat dem freundlichen Entgegenkommen des Herrn Dr. Guggenheim, Basel, dem wir auch an dieser Stelle hierfür unseren verbindlichsten Dank aussprechen möchten.

Nach Untersuchungen des einen von uns (F) mit P. Schröder[1]) dürfte das aber nicht zutreffen. Das Kleinhirn ist auch bei subakut gestorbenen Tieren völlig intakt, während die Medulla oblongata die schwersten Veränderungen an den Kernen zeigte. (Näheres darüber erfolgt in besonderer Mitteilung.)

XI. Wirkung der karotal-zentralen Einspritzung bei anderen Tierspezies.

Wenn im Sinn von Forssman die Giftigkeit der isogenetischen und heterogenetischen Antihammel-Kaninchensera lediglich auf den besonderen Beziehungen zum Meerschweincheneiweiß beruhte, so müßten z. B. beim Kaninchen, zu dessen Organe die Sera keine Affinität haben, die Symptome ausbleiben.

Aber Friedberger und Goretti (s. oben) haben schon gezeigt, daß die Erklärung von Forssman nicht zutreffend sein dürfte, und die Versuche, die wir an anderen Tierspezies mit karotal-zentraler Einspritzung von Seris angestellt haben, bestätigen und stützen unsere seitherigen Ansichten mit neuen Argumenten.

Wir wollen nunmehr die Versuche mit karotal-zentraler Einspritzung bei den anderen Tierspezies im einzelnen besprechen.

Rattenversuche. Zu den Tieren des Kaninchentypus gehört die Ratte. Bei ihr dürfte also die karotal-zentrale Einspritzung des für Meerschweinchen giftigen Antiserums keine entsprechenden Symptome hervorrufen. Dem scheint tatsächlich so zu sein. Ausgesprochene Symptome fehlen wenigstens.

31. I. 21. Ausgewachsene wilde Ratte (Mus rattus) erhält rechts karotal 0,1 Serum K, keine Symptome; 2. Ratte erhält 0.5 Serum rechts karotal (etwas ging verloren), Tier zeigt keine typischen Symptome, doch fällt ein Exophthalmus am linken Auge auf, während das rechte Augelid fast ganz geschlassen ist, die Reflexe sind erhalten, nach 10 Minuten macht das Tier einen schwerkranken Eindruck, sitzt auf den Hinterbeinen und pendelt mit dem Kopf hin und her, als ob es Gleichgewichtsstörung hätte, weitere Symptome sind jedoch nicht ausgesprochen.

---

1) Mitgeteilt in der Berliner Mikrobiolog. Gesellschaft. Sitzung vom 11. April 1921 (Demonstration von Diapositiven).

In der gleichen Gruppe wie die Ratte steht die Taube.

3. II. 21. Taube 1, 190 g, erhält 0,5 Serum K intrakarotal (nur ein Teil des Serums gelangt in die Blutbahn). Nach $2^1/_2$ Stunden zeigt das Tier plötzlich typische Manègebewegung gegen Uhrzeiger, Tonus vollständig verschwunden, Kopf liegt auf dem Tisch, dabei starker Opisthotonus (Kopf nach der Decke gerichtet), erneute Manègebewegungen bei Kopfhaltung nach hinten, tot nach $2^3/_4$ Stunden. Sektionsbefund: Herz schlägt noch.

Hier also trifft die Voraussetzung von Forssman nicht zu. Das Serum hätte für die Taube ebenso unempfindlich sein müssen, wie für die Ratte.

Noch ausgesprochener aber ist die Diskrepanz beim Kaninchen. Einige Versuche mögen folgen.

31. I. 21. Kaninchen No. 95, 1300 g, erhält 2,0 ccm inaktives Serum K rechts karotal-zentral in 10 Sekunden. Temperatur vor der Injektion 37,8°. Das Tier scheint zunächst ganz munter, nach $1^1/_2$ Stunden zeigt es plötzlich typische Manègebewegung gegen den Uhrzeiger, die eine Zeitlang anhält, Cornealreflex rechts etwas verzögert, die Manègebewegungen werden fortgesetzt. In der Zwischenzeit sitzt das Tier nach links zusammengeklappt mit Rechtskonvexität, genau wie das Meerschweinchen, auch die Kreuzung der Vorderbeine ist die gleiche, nach $1^3/_4$ Stunden erscheint der Cornealreflex rechts fast völlig verschwunden, nach 2 Stunden liegt das Tier schlaff auf der linken Seite, Cornealreflex rechts erloschen, links erhalten, Strabismus rechts nach der Nasenspitze.

Am 1. II. 21 liegt das Tier noch immer völlig gelähmt auf der linken Seite, ist schwer krank, typische Beinstellung, linkes Vorderbein nach hinten, rechtes nach vorne, Kopf liegt auf der linken Backe, stark nach dem Nacken zurückgezogen. Das Tier läßt sich nicht mehr aufrecht setzen, hebt man das rechte Bein, so beginnen Rollbewegungen in der Richtung linke Seite, Rücken, rechte Seite. Rechtes Auge Cornealreflex erloschen, Lidreflex erhalten, linkes Auge geschlossen, Reflexe erloschen. Legt man das Tier auf die rechte Seite, so streckt es den Kopf so stark nach dem Nacken, daß das Hinterhaupt völlig auf der Wirbelsäule ruht und die Schnauze direkt nach der Decke gerichtet ist. So bleibt es eine Zeitlang ruhig liegen, Temperatur 34°, linke Pupille reagiert nicht, jedoch die rechte. Das Tier wird am nächsten Morgen tot aufgefunden.

Sektionsbefund: Lunge etwas hyperämisch, sonst ohne Besonderheit.

1. II. 21. Kaninchen No. 97, 1100 g, erhält rechts karotal 2,5 ccm Antihammelblut-Ambozeptor Sch. Temperatur vor der Injektion 36,4°. Nach 18 Minuten rechte Pupille starr und eng, linke Pupille ebenfalls starr, aber weiter, nach 25 Minuten Corneal- und Lidreflexe noch erhalten, nach 28 Minuten starke Rollbewegung, Opisthotonus, Tier liegt auf der linken Seite, bei Anfassen der Beine beginnen Rollbewegungen, auf die rechte Seite gelegt, bleibt das Tier zunächst liegen Kopf ist jetzt nach vorn gebeugt, Tier wirft sich auf linke Seite mit typischer Beinstellung,

nach 35 Minuten Manègebewegung gegen den Uhrzeiger, Tier sitzt dannch auf den Hinterbeinen, Vorderhand völlig gelähmt, nach beiden Seiten ausgestreckt. Der Kopf ruht nach rechts gewendet auf linker Backe, tot am nächsten Morgen. Sektionsbefund: Lunge leicht hyperämisch, etwas gebläht; sonst normaler Befund.

2. II. 21. Kontrolle-Kaninchen No. 98, 1100 g, erhält 4,0 ccm Normalkaninchenserum (1/2 Stunde bei 56° inaktiviert), Injektionszeit 10 Sekunden, keine Symptome.

Diese Versuche lehren uns, daß das Antihammel-Kaninchenserum auch für das Kaninchen bei karotal-zentraler Einspritzung außerordentlich giftig ist, während normales Kaninchenserum natürlich wirkungslos ist.

XII. Bindungsversuche mit Kaninchengehirn.

Wir haben nun entsprechend den Versuchen beim Meerschweinchen verschiedene giftige Antisera mit normalem Kaninchengehirn ausgefällt und dann genau, wie früher beim Meerschweinchen, beim Kaninchen die Giftigkeit ermittelt.

Da ja, wie wir nunmehr wissen, das Serum für Kaninchen giftig ist, so lag es nahe, daß als Ausdruck dieser Giftigkeit eine Affinität der giftigen Komponente des Antiserums zum Gehirn bestehe, und daß daher auch in vitro das Kaninchenantiserum durch das Kaninchengehirn für das Kaninchen entgiftet wird, zumal wir ja auch schon eine gewisse Entgiftung des Serums durch das Kaninchengehirn für das Meerschweinchen gesehen zu haben glaubten.

Es wurden 6 g Kaninchengehirn, Kleinhirn, Großhirn und Medulla oblongata āā in 6 ccm Kochsalzlösung emulgiert. Dann wurde je 1,5 ccm Emulsion mit 6 ccm Antiserum K bzw. Normalkaninchenserum versetzt, 1 Stunde bei 37° belassen, dann zentrifugiert; noch zweimalige Wiederholung der Ausfällung in der gleichen Weise. Die Abgüsse wurden auf ihre Giftigkeit geprüft.

Es ergibt sich die überraschende Tatsache, daß die Giftigkeit anscheinend nicht im geringsten abgenommen hat, denn noch 0,2 des ausgefällten Serums wirkte giftig. Wir lassen einige dieser Versuche in extenso folgen.

9. II. 21. Kaninchen No. 95, 1140 g, erhält rechts karotal in 7 Sekunden 4,0 ccm des Abgusses K-Serum = 2,7 des Immunserums.

Tier liegt sofort auf der rechten Seite, zeigt klonische Krämpfe und stirbt nach 3 Minuten.

9. II. 21. Kaninchen No. 91, 1200 g, erhält 0,3 ccm des gleichen Abgusses = 0,2 Serum K, rechts karotal in 6 Sekunden.

Tier ist zunächst munter, nach 50 Sekunden Krämpfe 3 Minuten lang, Opisthotonus, Rollbewegung, Reflexe verlangsamt, Strabismus links nach der Schädeldecke, rechts nach der Nasenspitze, Cornealreflex rechts verschwunden, links erhalten, Pupille rechts starr, Rollbewegung, Tier liegt auf der rechten Seite, Vorderbeine nach links gekreuzt, vorgestreckt, erneute typische Rollbewegung. Tier liegt dann auf der rechten Seite Pupillenreflex jetzt auch links erloschen, Lidreflex erhalten, unausgesetzte Rollbewegungen, nach 24 Stunden tot.

10. II. 21. Kaninchen No. 63, 1500 g, erhält die gleiche Dosis wie voriges, rechts karotal in 6 Sekunden.

Typische Manègebewegung, Corneal- und Lidreflex zunächst beiderseits erhalten, Pupillenreflexe beiderseits geschwunden, Vorderbeine schlapp, Kopf nach links gedreht. Nach 24 Stunden neue Rollbewegung mit intensivem Schreien; Corneal- und Lidreflex jetzt rechts erloschen, links beides erhalten, links Pupillenreaktion erhalten, rechte Pupille starr. Nach mehrstündiger Ruhe tetanische Krämpfe, nach 3 Minuten beginnt der Krampf sich zu lösen; dann wieder Opisthotonus, Schwanz krampfhaft gegen den Rücken gestreckt, tot nach 28 Stunden.

Auffallend ist, daß bei einem anderen Tier eine etwas größere Dosis nur ein Erlöschen des Cornealreflexes rechts zur Folge hatte und keine ernsteren Symptome.

10. II. 21. Kaninchen No. 21, 1330 g, erhält 0,5 des gleichen Abgusses = 0,33 Serum rechts karotal in 6 Sekunden. Sofort Cornealreflex rechts erloschen; Pupillar- und Lidreflex beiderseits erhalten, keine weiteren Symptome.

Daß nicht etwa die Ausfällung mit Kaninchengehirn an sich die Symptome bedingt, zeigen die Kontrollversuche mit Normalkaninchenserum. (Tab. XXX, No. 90, 62, 97.)

Wenn der Organextrakt, wie das ja bekannt ist, auch in größeren Dosen giftig ist, so fehlen doch in jedem Fall die typischen Symptome.

Man könnte natürlich auch daran denken, daß es sich bei der geringen Entgiftung durch Kaninchengehirn — und teilweise gilt das auch für das Meerschweinchengehirn — um eine einfache Adsorptionswirkung handelt. Es wurde deshalb der Einfluß eines starken Adsorbens, nämlich der von Fried-

Tabelle XXX.

Auswertung des mit Kaninchengehirn ausgefällten Antikaninchenserum K resp. Normalkaninchenserum. Injektion der Abgüsse karotal-zentral r. Die Dosen entsprechen der absoluten Serummenge.

Datum	Kanin. No.	Gewicht in g	Menge des Serums	Tod	Symptome
9. II. 21	91	1200	0,2	—	Nach 3' typ. Rollbeweg., Strabism., Opisthoton., überlebt
10. II. 21	63	1500	0,2	24ʰ	Typische Symptome
10. II. 21	21	1330	0,33	—	Nur Cornealreflex r. erloschen
9. II. 21	95	1140	2,7	3'	Krämpfe
Kontrollen (Normalkaninchenserum).					
9. II. 21	90	1100	0,33	—	Keine Symptome
10. II. 21	62	1050	0,667	i. d. Nacht	dgl.
9. II. 21	97	1200	2,7	2'	Krämpfe

berger und Putter[1]) näher untersuchten Sornziger Erde, festgestellt.

1,0 g wurde in 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Je 1 ccm davon wurde mit 1 ccm 1 : 5 verdünntem Kaninchenimmunserum K bzw. Normalserum versetzt; 1 Stunde Brutschrank, dann stark zentrifugiert.

27. II. 21. Meerschweinchen No. 219, 170 g, erhält 1,0 ccm des Zentrifugats, gleich 0,1 Serum, keine Symptome.

In einem weiteren Versuch wurde Sornziger Erdeaufschwemmung in einem Verhältnis 5 : 1 mit $^1/_5$ verdünntem Serum versetzt und nach 24-stündigem Aufenthalt im Brutschrank je 3mal 20 Minuten zentrifugiert.

27. II. 21. Meerschweinchen No. 220, 180 g, erhält 4,0 Abguß = 0,4 Serum. Tier ist sofort schlapp, vereinzelte Krämpfe, aber Cornealreflexe bleiben erhalten, Strabismus fehlt, keine typischen Symptome, tot nach 6 Minuten.

In einem weiteren Versuch traten allerdings typische Symptome ein.

23. II. 21. Meerschweinchen No. 221, 160 g erhält die gleiche Dosis wie das vorige. Sofort Rollbewegungen, typischer Strabismus, typisches Verhalten der Cornealreflexe, typische Stellung, nach 5 Minuten Manègebewegungen gegen Uhrzeiger, nach 25 Minuten wieder Reflexe beiderseits

1) Diese Zeitschr., Bd. 30, 1920, S. 227.

vorhanden, nach 45 Minuten tot. (Hämolytischer Titer des ausgefällten Serums 0,01 gegen 0,0008.)

Es kann also tatsächlich durch Adsorbentien eine teilweise Entgiftung des Serums stattfinden, indem, wie wir gesehen haben, 0,1, d. h. die doppelt tödliche Dosis sicher ungiftig gemacht wird, nicht aber größere Dosen.

Tabelle XXXI.

Antihammel-Kaninchenserum K. Ausfällung mit Sornziger Erde. Abgüsse karotal-zentral r. (Mengen beziehen sich auf die absolute Serummenge.)

Datum	Meerschw. No.	Gewicht in g	Menge des Serums	Tod	Symptome
27. I. 21	219	170	0,2	—	Keine Symptome
27. I. 21	220	180	0,4	6'	Sofort Krampf und schlapp
27. I. 21	221	160	0,4	45'	Rollbewegung, Strabismus, Manège, Cornealreflex

XIII. Zusammenfassung.

1) Werden giftige Antihammel-Kaninchensera bei Meerschweinchen in die Carotis nach dem Herzen zu („karotalzentral") eingespritzt, so entsteht nicht das bei intravenöser Einspritzung zu beobachtende Symptomenbild der Anaphylaxie, sondern ein davon wesentlich abweichender Symptomenkomplex, der zuerst von Forssman beschrieben worden ist.

2) Die charakteristische Giftwirkung ist den isogenetischen wie heterogenetischen (Meerschweinchenniere, gekochtes Hammelblut) hammelhämolytischen Seris eigen und auch den Antiziegenblutseris.

3) Die Giftigkeit geht dem hämolytischen Titer nicht parallel.

4) Im Symptomenbild zeigen sich gewisse Phänomene (Augenstellung, Richtung der Manège- und Rollbewegungen, Verhalten der Cornealreflexe) bemerkenswert konstant.

5) Um über die Angriffsstelle des Serums im Organismus bei karotal-zentraler Einspritzung Aufschluß zu erhalten, werden Unterbindungsversuche, Einspritzung in die Aorta, ins Herz und in das Gehirn vorgenommen. Ferner wird der

Einfluß langsamer Injektion und der Injektion in größerem Volum untersucht.

6) Alter (Gewicht) der Tiere und Vagusdurchschneidung haben keinen, die Narkose nur einen unsicheren Einfluß auf das Symptomenbild.

7) $^1/_2$-stündiges Erhitzen des Serums auf 70° schwächt die giftige Wirkung des Serums von der Carotis aus ab, 80° zerstört sie.

8) Bei der Dialyse geht die karotal-zentrale Giftwirkung ebenso wie die Giftwirkung bei intravenöser Einspritzung (Friedberger und Goretti) und das passive Präparierungsvermögen (Friedberger, Schiff und Moore) in die Albuminfraktion.

9) Die Beziehungen zur Anaphylaxie werden untersucht:

a) Eine passive Präparierung läßt sich mit den karotal-zentral giftigen Seris für das entsprechende Antigen nicht erzeugen.

b) Mit Normalkaninchenserum präparierte Meerschweinchen sind nicht empfänglicher für die karotal-zentrale Einspritzung des Kaninchenantiserums. Vielleicht ist die Empfindlichkeit sogar etwas herabgesetzt.

c) Die Antianaphylaxie durch die intrakarotale Vorbehandlung mit untertödlichen Dosen wird nicht sicher und regelmäßig gegen die intrakarotale Reinjektion erzielt. Bei intravenöser Vorbehandlung oder Vorbehandlung ins Herz fehlt sie überhaupt vollständig.

d) Durch Vorbehandlung mit Normalkaninchenserum gelingt es nicht, wie bei der Anaphylaxie (Friedberger und Hjelt), die Symptome auszulöschen.

e) Durch Antianaphylaxie bei mit Kanincheneiweiß aktiv präparierten Tieren wird die Empfindlichkeit gegenüber dem giftigen Antihammel-Kaninchenserum karotal-zentral nicht herabgesetzt.

10) Die giftige Komponente des Antiserums wird von Blutkörperchen des Meerschweinchentypus, nicht aber von denen des Kaninchentypus (Mensch, Rind) gebunden. Auch an Meerschweinchengehirn, weniger deutlich an Kaninchengehirn, findet eine Bindung statt.

11) Eine Bindung an Lungengewebe läßt sich in Durchströmungsversuchen mit dem lebenden Organ nicht nachweisen.

12) Nicht nur die Antihammelblut-Kaninchensera sind giftig, sondern auch eine Reihe anderer Antisera vom Kaninchen- und Meerschweinchentypus.

13) Auch normale Sera bedingen in größeren Dosen karotal-zentral das gleiche Symptomenbild wie die Antisera (Normalkaninchenserum — Rinderserum — Aalserum).

14) Beim Schlangengift läßt sich zuweilen die gleiche Wirkung erzielen, doch ist sie meistens durch die lähmende Wirkung des Giftes verdeckt.

15) Chemische Gifte (β-Imidazolyläthylamin, Strychnin, Koffein) bedingen bei karotal-zentraler Einspritzung nicht das Symptomenbild wie giftige Sera.

16) Auf Grund histologischer Untersuchungen (Friedberger-Schröder) ergibt sich, daß das giftige Antiserum nicht im Kleinhirn (Forssman), sondern in der Medulla oblongata angreift und hier schwere Veränderungen an den Kernen hervorruft.

17) Das Antiserum ist nicht nur für das Meerschweinchen bzw. Tiere des Meerschweinchentypus giftig, sondern auch für Kaninchen und Taube.

18) Ob in vitro eine Bindung an das Kaninchengehirn stattfindet, läßt sich nicht mit Sicherheit entscheiden, da auch eine Adsorption an anorganische Adsorbentien (Kaolin) vorhanden ist.

Zur Bedeutung der paradoxen Reaktion auf Diphtheriebouillon beim Menschen.

(Erwiderung auf die Entgegnung von Bessau.)

Von **Karl Kassowitz** (Wien).

(Eingegangen bei der Redaktion am 17. September 1921.)

Der Gegensatz zwischen Herrn Bessau und uns in der Auffassung des von B. Schick (1) und von Bessau (2) zum erstenmal beobachteten, von v. Gröer und Kassowitz (3) zum erstenmal studierten und als „paradoxe Reaktion" bezeichneten Phänomens beruht keineswegs in erster Linie auf Unterschieden in der Nomenklatur bei sonstiger „sachlicher Uebereinstimmung", wie Herr Bessau behauptet. Wenn dies der Fall wäre, so hätten wir sicher nicht gezögert, die auch unserer Ansicht nach aus Bakterienleibern stammende wirksame Substanz der Diphtheriebouillon als Endotoxin zu bezeichnen. Dies war aber nach unserer Auffassung nicht angängig, da die Bezeichnung Endotoxin für ein Produkt aus Bakterienleibern mit ganz bestimmten Eigenschaften bereits vergeben ist, Eigenschaften, die von denjenigen unseres Bakterienproduktes wesentlich abweichen. Bessau widerspricht sich selbst, wenn er zu unserer Bezeichnung „alkalilösliche Diphtheriebazillenleiber Bestandteile, welche in der gewöhnlichen Diphtheriebouillon enthalten sind", hinzusetzt: „das nennen wir Endotoxin". Denn weiter unten bemerkt er ganz richtig: „Eine Ueberempfindlichkeit gegen Endotoxin gibt es überhaupt nicht." Wir haben nun nachgewiesen, daß erstens eine Sensibilisierung mit Diphtheriebazillenaufschwemmung erzielt werden kann, und zweitens, daß die bei manchen Individuen enorm gesteigerte Empfindlichkeit auf dieses „sensibilisierende Endotoxin" außerdem eine aspezifische ist, wegen ihres weitgehenden Parallelismus mit Typhusbazillennukleo-

proteid und in gewissem Grade auch mit Adrenalin-Coffeinlösung. Damit ist doch jedenfalls hinreichend klargestellt, daß der Unterschied nicht nur in der Bezeichnung besteht. Es könnte im Gegenteil fast notwendig erscheinen, für das wirksame Prinzip aus Bakterienleibern, welches sich in den wesentlichen Punkten vom primärtoxischen, streng spezifischen, nicht allergisierenden Endotoxin unterscheidet, nach dem Vorschlag von B. Schick den neuen Namen Endoallergen zu prägen, womit die Provenienz und wesentlichste Eigenschaft dieses Antigens deutlich zum Ausdruck käme. Es erscheint uns nicht berechtigt, die Tatsache der fallweisen enormen Steigerung der intrakutanen Empfindlichkeit auf dieses Allergen gegenüber der so geringen normalen Empfindlichkeit einfach mit der Feststellung von „verschiedenen Graden der Empfindlichkeit" allgemein abzutun. Wir haben den Schritt zur Analyse der Bedingungen des Zustandekommens dieser rätselhaften Ueberempfindlichkeit mit vollem Bewußtsein getan und haben auch weiter keinen Grund, von unserer Auffassung abzugehen trotz der Kritik von Bessau.

Literatur.

1) B. Schick, 80. Versamml. Deutscher Naturf. und Aerzte, Köln 1908.
2) G. Bessau, Mündliche Mitteilung an B. Schick, 1912.
3) v. Gröer und Kassowitz, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 23, 1914.
4) Bessau und Schwenke, Monatsschr. f. Kinderheilk., Bd. 13, 1915.
5) v. Gröer und Kassowitz, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 26, 1917; Bd. 28, 1919; Bd. 30, 1920.

Anmerkung bei der Korrektur.

Herr Prof. v. Gröer-Lemberg, welcher während der Ferien nicht zu erreichen war, teilt mir soeben zu der Kritik Bessaus folgendes mit:

„Bessau und seine Mitarbeiter haben behauptet, daß die sogenannte ‚paradoxe' Reaktion durch die Wirkung der Endotoxine des Diphtheriebazillus zustande kommt. Wir haben diese Auffassung unter der Voraussetzung als falsch

bezeichnet, daß unter Endotoxinen ,spezifische Giftstoffe, welche im Bazillenleib präformiert sind und auch spezifische Reaktionen auszulösen befähigt sind', verstanden werden. Nach unserer Auffassung entsteht die paradoxe Reaktion infolge konditionell erworbener Eigenschaft des Organismus, auf viele niedermolekulare Eiweißstoffe und -derivate quantitativ überempfindlich zu reagieren. Dieser unserer Standpunkt wird in der letzten Zeit durch die in anderem Zusammenhange angestellten Versuche der Lemberger Kinderklinik gestützt. Aus diesen Versuchen geht hervor, daß dieselben Individuen, welche die paradoxe Reaktion aufweisen, auch gegenüber allen möglichen anderen Substraten, wie Albumosen, Peptone, Kasein usw., sich als überempfindlich erweisen. Es wäre unseres Erachtens mindestens gezwungen, anzunehmen, daß alle diese Substrate eine mit dem hypothetischen Endotoxin des Diphtheriebazillus identische chemische Gruppe enthalten. Wir ziehen es vor, ohne dieses, auch sonst strittigen Begriffes auszukommen, zumal wir es hier zweifellos mit unspezifischen Erscheinungen zu tun haben. Bessau kritisiert weiter unsere Bezeichnung des fraglichen Phänomens als ,Ueberempfindlichkeit'. Die Tatsache, daß von 2 Individuen das eine auf die Injektion von Diphtheriebazillennukleoproteid mit einer entzündlichen Reaktion, das andere hingegen mit keinerlei Erscheinungen antwortet, kann meines Erachtens entweder als Ueberempfindlichkeit des einen oder als Unterempfindlichkeit des zweiten bezeichnet werden. Da aber die ,Unterempfindlichkeit' im ganzen häufiger vorkommt als die Ueberempfindlichkeit, so sind wir wohl berechtigt, das häufigere Verhalten als Norm, das seltenere hingegen als Ueberempfindlichkeit aufzufassen. Daß diese Ueberempfindlichkeit quantitativ abgestuft werden kann, ändert an der Sache nichts, denn dieser Tatsache begegnen wir überall dort, wo wir mit primär toxischen Substraten zu tun haben. Was nun den Entstehungsmechanismus dieser konditionell erworbenen Ueberempfindlichkeit oder, wie Bessau es will, dieser ,erhöhten' Empfindlichkeit mancher Individuen gegen Bazilleneiweiß und manche andere Substrate betrifft, so haben

wir uns erlaubt, eine Arbeitshypothese aufzustellen, die wohl auf manche klinische Erfahrung gestützt ist. Daß Bessau diese Hypothese für unbewiesen hält, ist nichts dagegen einzuwenden. Sie wird aber erst dann kritikreif, wenn wichtige Tatsachen gegen sie vorgebracht werden können. Das hat bisher Bessau nicht getan. Wir sind weiter mit dieser Frage beschäftigt, und hoffen, bald zeigen zu können, daß diese unsere Hypothese sich durch einwandfreies Tatsachenmaterial stützen läßt."

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena. — 4971

Zeitschrift f. Immunitätsforschung. Originale. Bd. 33. Heft 2.

[Aus dem Hygiene-Institut der Universität Greifswald (Direktor: Prof. Dr. E. Friedberger).]

Beiträge zur Agglutination der X-Stämme.

Von Dr. **S. Büchner** und Dr. **W. Zorn.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 30. Mai 1921.)

Bald nach Entdeckung der Weil-Felixschen Reaktion stellte es sich heraus, daß keine völlige Uebereinstimmung zwischen dem Verhalten der Krankensera und der durch Vorbehandlung mit den Weil-Felixschen Bazillen hergestellten (Kaninchen-)Immunsera besteht. Die Unterschiede traten zutage einerseits bei der Prüfung erhitzter Immunsera und Antisera, andererseits bei der Einwirkung durch Erhitzen, längeres Stehenlassen oder Zusatz von Chemikalien veränderten Bakterien.

Das Vorhandensein von solchen Differenzen war vom theoretischen Standpunkt aus bemerkenswert. Von verschiedenen Autoren wurde deshalb der naheliegende, wenn auch keineswegs zwingende Schluß gezogen, daß es sich bei der Weil-Felixschen Reaktion gar nicht um eine echte Antigen-Antikörperreaktion handeln könne, da ja Kaninchenserum, für dessen Herstellung die X-Bazillen als Antigen verwendet waren, in wesentlichen Punkten sich anders verhalten sollten als die Patientensera.

Elias[1]) und Epstein[2]) meinten, daß beim Fleckfieberkranken lediglich eine physikalisch-chemische Veränderung des Serums vorliege, die ihrem Wesen nach nichts mit einer echten Antigen-Antikörperreaktion zu tun habe. Andere Autoren erkannten zwar die Antikörpernatur der Fleckfieberkrankensera an, die Antikörper sollten aber nicht durch das Vor-

1) Elias, Wiener klin. Wochenschr., 1918, No. 11.

2) Epstein, Wiener med. Wochenschr., 1918, No. 36; Epstein und Morawetz, Wiener med. Wochenschr., 1917, No. 13.

handensein der X-Bazillen im Körper hervorgerufen sein, sondern ihre Entstehung und Spezifität einem merkwürdigen Spiele des Zufalls oder anderer Momente verdanken [Hamburger und Bauch[1]), Kolle und Schloßberger[2]), Braun[3])].

Von Dietrich[4]), Kuhn[5]), Woithe[6]), Oettinger[7]) wurde die Weil-Felixsche Reaktion als Paragglutination gedeutet.

Weil und Felix halten ihre Reaktion für eine Antikörperreaktion, die durch das betreffende Antigen, den X-Bazillus, hervorgerufen wird eine Ansicht, die außer ihnen nur noch Friedberger[8]), Schiff[9]) und Zlocisti[10]) vertreten.

Friedberger[8]) hat dann auf Grund der in der Literatur vorliegenden Tatsachen sowie eigener Bindungsversuche die Ansicht vertreten, daß der Bazillus X 19 als Erreger des Fleckfiebers anzusehen sei.

Die Verschiedenheit zwischen Fleckfieberkrankenserum und Kaninchenimmunserum bot aber für diese Annahme gewisse Schwierigkeiten. Den Weg zu einer befriedigenden Erklärung wiesen neue Untersuchungen von Weil und Felix über die O- und H-Form. Die O- und H-Formen sind serologisch voneinander zu unterscheiden. Die O-Form wird stets nur in feinen Flocken, die H-Form in groben Flocken agglutiniert. Durch Immunisierung von Kaninchen mit O-Bazillen lassen sich Sera gewinnen, die eine scharfe Unterscheidung der beiden von Weil und Felix beschriebenen Typen der X-Bazillen ermöglichen. Diese „reinen O-Sera" agglutinieren nur die O-Form desjenigen Typus der X-Bazillen (X 2 bzw. X 19), der zur Immunisierung verwendet worden war. Da-

---

1) Hamburger und Bauch, Deutsche med. Wochenschr., 1917, No. 36 und 39.

2) Kolle und Schloßberger, Med. Klinik, 1917, No. 10.

3) Braun und Salomon, Deutsche med. Wochenschr., 1918, No. 3.

4) Dietrich, Deutsche med. Wochenschr., 1916, No. 51.

5) Kuhn, Centralbl. f. Bakt., Bd. 80, H. 1—3, p. 107.

6) Kuhn und Woithe, Med. Klinik, 1909, p. 1709.

7) Oettinger, Centralbl. f. Bakt., Bd. 80, H. 6, p. 304.

8) Friedberger, Deutsche med. Wochenschr., 1919, No. 42—44.

9) Schiff, Deutsche med. Wochenschr., 1917, No. 41.

10) Zlocisti, Ergebnisse der Hyg., Bakt., Immunitätsforschung und experiment. Therapie, Bd. 4, 1920.

gegen agglutinieren die mit der H-Form hergestellten Immunsera gleichzeitig die H-Form des X 19- und X 2-Typus. Weil und Felix fanden weiter, daß die Sera der Fleckfieberkranken die X-Bazillen immer nur feinflockig agglutinieren. Sie entsprechen darin dem reinen O-Serum, das beim Kaninchen durch Immunisierung mit der O-Form des X 19 hergestellt werden kann. Soweit die Fleckfiebersera Agglutinine gegen die X 2-Bazillen enthalten, entsprechen die Sera dem reinen OX 2-Serum des Kaninchens.

Weil und Felix haben nun ferner gefunden, daß die Unterschiede, die zwischen Fleckfieberkrankenseris und Immunseris aufgefallen waren, auf einem differenten Verhalten der gegen die O- und gegen die H-Form wirksamen Agglutinine beruhen, und zwar unabhängig davon, ob die Antikörper durch den Krankheitsprozeß beim Menschen oder durch künstliche Immunisierung im Tier entstehen. Demgemäß bestehen zwischen dem O-Immunserum des Kaninchens und dem H-Immunserum dieselben Unterschiede wie zwischen dem letzteren und dem Fleckfieberkrankenserum. Unterschiede zwischen OX 19-Immunserum des Kaninchens und Fleckfieberkrankenserum sind aber bisher nicht bekannt. Insbesondere haben Weil und Felix gezeigt, daß Unterschiede in der Thermolabilität zwischen Fleckfieberkrankenserum und Immunserum zurückzuführen sind auf eine größere Thermolabilität der O-Agglutinine überhaupt.

Ein weiterer, zunächst nicht erklärbarer Unterschied zwischen Fleckfieberkrankenserum und Kaninchenimmunserum bestand darin, daß durch vorsichtiges Erhitzen (50°—56°) oder Altern der H-Form zwar die Ausflockung durch Fleckfieberkrankenserum, aber nicht durch Kaninchenimmunserum erschwert oder verhindert wurde. Schiff und Nathorff[1]) stellten fest, daß auch diese Unterschiede auf einem verschiedenen Verhalten der O- und H-Agglutinine überhaupt, nicht aber auf einem Unterschied der Fleckfieberkranken- und Immunagglutinine beruhen.

---

1) Schiff und Nathorff, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 30, 1920, Heft 5/6.

Die bisher vorliegenden Untersuchungen erstreckten sich im wesentlichen auf menschliche Patientensera und auf Immunsera des Kaninchens. Untersuchungen, die die beim Menschen künstlich erzeugten Immunagglutinine betreffen, liegen von Praußnitz[2]) vor, scheiden hier aber aus, da die Unterschiede der O- und H-Form nicht berücksichtigt wurden. Neuerdings ist es nun Weil und Felix durch Vorbehandlung mit dem Gehirn fleckfieberinfizierter Meerschweinchen gelungen, beim Kaninchen Agglutinine gegen X 19 zu erzeugen. Es ist von großem Interesse, festzustellen, wie sich diese „Fleckfieberkaninchenvirussera" verhalten.

Hierüber liegt bis jetzt eine kurze Angabe von Weil und Felix vor, wonach diese Kaninchensera die X 19-Bazillen nur in feinen Flocken agglutinieren.

So ist eine große Reihe von Tatsachen über das Verhalten der X-Bazillen und auch der Proteusbazillen der Gruppe III gegenüber den verschiedenen Seris bekannt geworden. Doch fehlten noch Untersuchungen über das Verhalten der Bazillen der Gruppe III, der H-Form des X 2, der O- und H-Form des X 19 auf 50—56° und mehr als 60° erhitzt gegenüber den 1 Stunde auf 70° erhitzten Fleckfieberkrankenseris, OX 19-, HX 19- und HX 2-Immunseris. Das, was auf Grund unserer Kenntnisse über das Wesen der O- und H-Rezeptoren und der Agglutinine hier zu erwarten war, ist bereits in einer früheren Arbeit aus unserem Institut von Friedberger und Schröder[1]) in einer Tabelle zusammengefaßt worden. Auf Veranlassung von Herrn Prof. Friedberger und unter seiner Leitung haben wir nun in eingehenden Versuchen festgestellt, inwieweit die tatsächlichen Befunde den theoretisch aufgestellten Vermutungen entsprechen. Im Nachstehenden soll über diese Versuche berichtet werden.

Wir haben das Verhalten der Fleckfieberagglutinine des Kaninchens im einzelnen untersucht und daneben gleichzeitig sowohl Fleckfieberpatientensera wie auch durch Vorbehandlung mit Bazillen (X 2, O- und H-Form des X 19) hergestellte Kaninchenimmunsera geprüft.

---

1) Praußnitz, Deutsche med. Wochenschr., 1920, No. 12.

2) Friedberger und Schröder, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 31, 1921, H. 4/5.

Wir untersuchten zunächst ein durch Immunisierung mit der H-Form des X 19 hergestelltes Kaninchenimmunserum in frischem Zustand und nach 1-stündigem Erhitzen auf 70°. Die geprüften Bakterien waren folgende: O- und H-Form des X 19, H-Form des X 2, ein Proteusstamm der Gruppe III von Braun[1]). Die O- und H-Form des X 19 wurde außer in frischen Emulsionen auch nach 1-stündigem Erhitzen auf 52° und nach Erhitzen auf 100° untersucht.

Technik: In allen Versuchen wurden 24-stündige Schrägagarkulturen der Bazillen von möglichst gleichweiten Röhrchen mit 1—2 ccm Kochsalzlösung abgeschwemmt und je ein Tropfen der Abschwemmung zu den Serumverdünnungen hinzugegeben. Das Erhitzen auf 100° erfolgte in der Weise, daß die Aufschwemmungen in ein Wasserbad bei Zimmertemperatur eingestellt wurden, das dann in ungefähr 5 Minuten auf 100° erwärmt wurde. Die Emulsion blieb bei 100° noch 10 Minuten im Wasserbad. Zur Konservierung der Sera wurde auf je 1 ccm Serum 0,1 ccm einer 5-proz. Karbolsäurelösung hinzugesetzt.

In sämtlichen Tabellen bedeutet

g grobflockige Agglutination,
f feinflockige „

Die Ablesung erfolgte nach 2 Stunden 37° und nochmals nach weiteren 20 Stunden bei Zimmertemperatur. In den Tabellen sind die Resultate der Einfachheit halber in der Regel nur nach 2 Stunden 37° wiedergegeben. Es bedeutet

+++ }
++ } makroskopisch sichtbare Agglutination verschiedenen Grades,
+ }
(+) Agglutination deutlich, aber nur mit Lupe sichtbar,
(±) eben noch mit der Lupe sichtbar,
— keine Agglutination.

Es wurde zunächst das Verhalten des HX 19-Kaninchenimmunserums untersucht.

Das Serum für die Versuche I und II stammt von einem 1500 g schweren Kaninchen, das am 28. I. 1921 mit $^1/_5$ Oese durch 1-stündiges Erhitzen auf 60° abgetöteter HX 19-Bazillen, am 5. II. mit $^1/_2$ Oese und am 12. II. ebenfalls mit $^1/_2$ Oese vorbehandelt war. Blutentnahme am 20. II.

---

1) Für die freundliche Ueberlassung dieses Stammes sagen wir Herrn Prof. Braun in Frankfurt a. M. besten Dank.

Tabelle I.

HX 19-Kaninchenimmunserum.

Bazillen	Serumverdünnungen							NaCl	Typ. d. Aggl.
	100	200	500	1000	2000	5000	10000		
HX 19	++	++	++	+	—	—	—	—	g + f
OX 19	++	++	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	—	f
HX 2	++	++	+	(±)	—	—	—	—	g
Gruppe III	+	+	—	—	—	—	—	—	g
HX 19 52°	+	+	—	—	—	—	—	—	g
„ 100°	—	—	—	—	—	—	—	—	
OX 19 52°	(±)	(±)	(±)	—	—	—	—	—	f
„ 100°	—	—	—	—	—	—	—	—	
HX 19 100°	+	+	(+)	(±)	—	—	—	—	f
OX 19 100°	+	+	(+)	(±)	—	—	—	—	f

Die beiden letzten Zeilen unter dem Doppelstrich zeigen das Resultat der Ablesung nach 2 Stunden 37° plus 20 Stunden Zimmertemperatur.

Ergebnis: Das Serum agglutiniert mit bloßem Auge sichtbar die H-Form des X 19 bis 1 : 1000, die des X 2 bis 1 : 500; die O-Form wird bis zur 200-fachen Verdünnung deutlich agglutiniert. Es handelt sich demnach um ein HX 19-Immunserum im Sinne von Weil und Felix. Dem entspricht auch, daß das Serum Agglutinine, und zwar grobflockende, gegen die Gruppe III von Braun enthält. Diese Gruppe umfaßt diejenigen Proteusstämme, die mit den X-Stämmen H-Rezeptoren teilweise gemeinsam haben. Das Serum ist deutlich, wenn auch abgeschwächt, gegenüber den auf 52° erhitzten H-Bazillen der X 19-Gruppe wirksam. Die auf 100° erhitzten X 19-Bazillen werden in der O- und H-Form agglutiniert, und zwar feinflockig. Die Agglutination tritt aber, wie das seit Csépai[1]), Sachs[2]) sowie Schiff[3]) bekannt ist, verspätet ein. Auffallend und von den sonstigen Beobachtungen [Sachs und Schloßberger[4])] abweichend ist, daß in diesem Versuch die O-Form durch Erhitzen auf 52° ihre Agglutinierbarkeit scheinbar fast völlig eingebüßt hat. Nach 22 Stunden zeigte sich aber eine deutliche, verspätet eingetretene Agglutination.

1) Csépai, Wiener klin. Wochenschr., 1917, No. 38 und 40.

2) Sachs, Deutsche med. Wochenschr., 1917, No. 31.

3) Schiff, Deutsche med. Wochenschr., 1917, No. 41.

4) Sachs und Schloßberger, Arbeiten a. d. Inst. f. exp. Ther., 1919, No. 6.

Den Einfluß der Erwärmung auf 70° auf die Agglutinine des HX 19-Kaninchenimmunserums zeigt folgender Versuch.

Tabelle II.
HX 19-Kaninchenimmunserum 1 Std. auf 70° erhitzt.

Bazillen	Serumverdünnungen				NaCl	Typ. d. Aggl.
	100	200	500	1000		
HX 19	+	(+)	(+)	—	—	g
OX 19	—	—	—	—	—	
HX 2	(+)	(+)	(±)	—	—	g
Gruppe III	(+)	(±)	—	—	—	g
HX 19 52°	(+)	(+)	—	—	—	g
„ 100°	—	—	—	—	—	
OX 19 52°	—	—	—	—	—	
„ 100°	—	—	—	—	—	

Es ergibt sich, daß durch Erhitzen die O-Komponente des Serums unwirksam geworden ist. Auch die H-Komponente ist abgeschwächt, wie aus der Abnahme des Titers für die H-Rezeptoren führenden Bakterien (HX 19, HX 2, Gruppe III) hervorgeht. Eine völlige Zerstörung der H-Agglutinine ist aber im Gegensatz zu den O-Agglutininen nicht erfolgt.

In den beiden folgenden Versuchen ist das Verhalten eines gegen die X 2-Gruppe gerichteten Kaninchenimmunserums dargestellt. Die zur Vorbehandlung verwendeten Bazillen gehörten der H-Form an.

Tabelle III.
HX 2-Kaninchenimmunserum.

Bazillen	Serumverdünnungen							NaCl	Typ. d. Aggl.
	100	200	500	1000	2000	5000	10000		
HX 19	++	++	++	+	(±)	—	—	—	g
OX 19	—	—	—	—	—	—	—	—	
HX 2	++	++	++	++	(±)	—	—	—	g + f
Gruppe III	+	+	+	(+)	(+)	(±)	—	—	g
HX 19 52°	++	++	+	(+)	(±)	—	—	—	g
„ 100°	—	—	—	—	—	—	—	—	
OX 19 52°	—	—	—	—	—	—	—	—	
„ 100°	—	—	—	—	—	—	—	—	

Das Serum ist ein typisches HX 2-Immunserum; das kommt dadurch zum Ausdruck, daß zwar die H-Form des X 2- und X 19-Bazillus agglutiniert wird, dagegen die O-Form

des X 19 überhaupt nicht. Die H-Form des X 2 wird in groben und feinen Flocken, die des X 19 nur in groben Flocken agglutiniert, ebenso die der Gruppe III. Erhitzen der Bazillen auf 52° läßt die H-Form fast intakt. Die O-Form bleibt, wie zu erwarten war, nach dem Erhitzen unbeeinflußt.

Tabelle IV zeigt das Verhalten des 1 Stunde auf 70° erhitzten Serums, das bisher noch nicht untersucht war.

Tabelle IV.

HX2-Kaninchenimmunserum 1 Std. auf 70° erhitzt.

Bazillen	Serumverdünnungen						Kontrolle	Typ. d. Aggl.
	100	200	500	1000	2000	5000		
HX 19	+	(+)	(±)	—	—	—	—	g
OX 19	—	—	—	—	—	—	—	
HX 2	(+)	(+)	(±)	—	—	—	—	g
Gruppe III	(+)	(+)	(+)	(±)	(±)	—	—	g
HX 19 52°	(+)	(+)	—	—	—	—	—	g
„ 100°	—	—	—	—	—	—	—	
OX 19 52°	—	—	—	—	—	—	—	
„ 100°	—	—	—	—	—	—	—	

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß das erhitzte Serum die zu den O-Rezeptoren des HX 2 passenden Agglutinine verloren hat. Außerdem sind auch die H-Agglutinine abgeschwächt.

Die bisherigen Versuche zeigen in Bestätigung der Angaben von Weil und Felix die stärkere Thermolabilität der O-Agglutinine. Die H-Agglutinine sind nicht nur im X 19-Immunserum, wie Weil und Felix gezeigt hatten, sondern ebenso auch im X 2-Immunserum in höherem Grade hitzebeständig.

Zu den beiden nächsten Versuchen wurde das Serum eines Kaninchens verwendet, das mit der O-Form des X 19 behandelt worden war.

Das Tier von 1500 g wurde am 2. II. 1921 mit $^1/_5$ Oese durch 1-stündiges Erhitzen auf 60° abgetöteten OX 19-Bazillen gespritzt, am 9. II. mit $^1/_2$ Oese und ebenso am 17. II. mit $^1/_2$ Oese. Am 24. II. Blutentnahme.

Bekanntlich gelingt es nur sehr schwer, Kaninchenimmunsera zu erhälten, denen H-Agglutinine völlig fehlen. Aus den Bazillen, die zur Vorbehandlung verwendet wurden, waren

daher etwa vorhandene H-Rezeptoren durch 1-stündiges Erhitzen auf 60° nach Möglichkeit entfernt.

Tabelle V.

OX 19-Kaninchenimmunserum („reines O-Serum").

Bazillen	Serumverdünnungen						Typ. d. Aggl.
	100	200	500	1000	2000	Kontr.	
HX 19	+	(+)	(±)	—	—	—	f
OX 19	++	++	+	(±)	—	—	f
HX 2	—	—	—	—	—	—	
Gruppe III	—	—	—	—	—	—	
HX 19 52°	—	—	—	—	—	—	
„ 100°	+	+	(±)	—	—	—	f
OX 19 52°	+	+	—	—	—	—	f
„ 100°	(+)	(+)	—	—	—	—	f

Tabelle V zeigt, daß das hier gewonnene Serum völlig den Anforderungen an ein reines O-Serum entspricht. X 19-Bazillen werden in der O-Form bis zur Verdünnung 1:500, in der H-Form bis zu 200-facher Verdünnung deutlich agglutiniert, X 2-Bazillen und die der Gruppe III dagegen gar nicht. Die O-Form des X 19 wird nach schwächerem und stärkerem Erhitzen noch agglutiniert, die H-Form wohl nach Erhitzen auf 100°, nicht aber nach Erhitzen auf 52° (Sachs und Schloßberger)[1]). Die Agglutination ist feinflockig.

Tabelle VI.

Reines O-Serum, 1 Std. auf 70°.

Bazillen	Serumverdünnung 1:100—1:10 000
HX 19	Alle negativ.
OX 19	
HX 2	
Gruppe III	
HX 19 52°	
„ 100°	
OX 19 52°	
„ 100°	

Aus Tabelle VI ist zu erkennen, daß durch Erhitzen auf 70° sämtliche Agglutinine aus dem Serum entfernt sind. Der

1) Sachs und Schloßberger, Arb. aus dem Inst. für exper. Ther. in Frankfurt a. M., 1919, Heft 6.

Gegensatz zwischen dem reinen O-Serum und den HX 19- und HX 2-Immunsera ist hier also stark ausgesprochen.

Das im Versuch VII und VIII verwendete Menschen-Fleckfieberserum stammt von einem Fleckfieberkranken in Posen und wurde uns von Herrn Dr. Haase in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt.

Tabelle VII.

Fleckfieberkrankenserum.

Bazillen	Serumverdünnungen							Typ. d. Aggl.
	100	200	500	1000	2000	5000	Kontr.	
HX 19	+	+	(+)	(+)	(±)	—	—	f
OX 19	++	++	+	+	(+)	—	—	f
HX 2	(±)	(±)	—	—	—	—	—	?
Gruppe III	—	—	—	—	—	—	—	—
HX 19 52°	(±)	(±)	(±)	—	—	—	—	f
„ 100°	++	++	+	(+)	—	—	—	f
OX 19 52°	++	+	+	(+)	(+)	—	—	f
„ 100°	+	(+)	(+)	(±)	(±)	—	—	f

Die Aehnlichkeit der Tabelle VII mit der Tabelle V fällt sofort ins Auge. Der Typ der Agglutination ist überall feinflockig. Stark agglutiniert wird die O- und H-Form des X 19 mit Ausnahme der auf 52° erhitzten H-Form. Nicht oder fast gar nicht agglutiniert werden die X 2-Bazillen und die der Gruppe III. Ein Unterschied zwischen den beiden Tabellen besteht nur darin, daß das Fleckfieberkrankenserum auch die X 2-Bazillen und die auf 52° erhitzten X 19-Bazillen der H-Form, allerdings beide sehr schwach, agglutiniert. Diese beiden Unterschiede stehen nicht im Widerspruch zu den bisherigen Erfahrungen. Es ist bekannt, daß manche Fleckfieberkrankensera auch die X 2-Bazillen agglutinieren. Ob es sich um eine feine oder grobe Agglutination handelt, war in unserem Falle bei dem geringen Grade der Reaktion nicht zu erkennen. Da aber Agglutinine gegen die Gruppe III, die mit den X 2-Bazillen H-Rezeptoren gemeinsam haben, fehlten, so ist anzunehmen, daß es sich um O-Rezeptoren handelte. Auch das Vorliegen einer geringen Agglutination bei der auf 52° erhitzten H-Emulsion ist nicht befremdend, da Erhitzen auf 52°

nicht immer die Agglutinierbarkeit aufhebt, sondern oft nur abschwächt. Der Grad der Abschwächung schwankt, wie Schiff und Nathorff fanden, je nach dem Gehalte der Emulsionen an H-Rezeptoren, und dieser kann von Tag zu Tag etwas wechseln.

Es war nun von erheblichem Interesse, des weiteren auch hier das Verhalten des erhitzten Serums zu untersuchen.

Tabelle VIII.

Fleckfieberpatientenserum 1 Std. auf 70° erhitzt.

Bazillen	Serumverdünnung 1:100—1:10000
HX 19	Alle negativ.
OX 19	
HX 2	
Gruppe III	
HX 19 52°	
„ 100°	
OX 19 52°	
„ 100°	

Aus Tabelle VIII geht hervor, daß aus dem erhitzten Fleckfieberkrankenserum ebenso wie aus dem erhitzten O-Immunserum (siehe Tabelle V) sämtliche Agglutinine geschwunden sind.

Wir untersuchten nun weiter, wie sich die Agglutinine im Serum eines Kaninchens verhalten, das mit Fleckfieberpassagevirus (Meerschweinchengehirn) vorbehandelt war.

Das Kaninchen, 1500 g, wurde am 7. XII. 1920 mit 2 ccm Fleckfieber-Meerschweinchenvirus intravenös behandelt. Die Emulsion wurde durch Verreiben eines halben Meerschweinchengehirns in 10 ccm Kochsalzlösung hergestellt; es wurde nur der Abguß injiziert, der sich nach leichter Zentrifugierung gebildet hatte.

Durch Vorbehandlung mit Passagevirus gelingt es zwar regelmäßig, beim Kaninchen Agglutinine gegen X 19 zu erzeugen. Der erzielte Titer bleibt aber stets hinter dem durchschnittlichen Titer der menschlichen Fleckfiebersera zu Ende der Fieberperiode erheblich zurück. Das hier verwendete Serum, das die O-Form nach 2 Stunden bei 37° in 200-facher Verdünnung agglutiniert, war eins der stärksten Sera unseres Instituts.

Tabelle IX.
Kaninchenvirusserum.

Bazillen	Serumverdünnungen						Typ. d. Aggl.
	100	200	500	1000	2000	Kontrolle	
HX 19	(+)	(±)	—	—	—	—	f
OX 19	++	++	(+)	(±)	—	—	f
HX 2	—	—	—	—	—	—	
Gruppe III	—	—	—	—	—	—	
HX 19 52°	—	—	—	—	—	—	
„ 100°	+	+	(±)	—	—	—	f
OX 19 52°	++	++	—	—	—	—	f
„ 100°	++	+	(±)	—	—	—	f

Tabelle IX zeigt, daß sich das Kaninchenvirusserum serologisch genau wie das reine O-Immunserum (s. Tabelle IV) und das Patientenserum (s. Tabelle VII) verhält. Die Agglutination ist stets feinflockig, und Agglutinine treten nur gegen jene Bakterien auf, die OX 19-Rezeptoren enthalten. Nicht agglutiniert werden also wiederum die X 2-Bazillen und die der Gruppe III. Von den Bazillen der X 19-Gruppe wird nur die H-Form nach Erhitzen auf 52° nicht agglutiniert. Das Fleckfiebervirusserum wirkt also auch gegenüber diesen Bazillen genau so wie das menschliche Fleckfieberserum und das OX 19-Immunserum.

Eine weitere Uebereinstimmung zwischen Fleckfiebervirusserum und den beiden erwähnten Seris ergab sich bei der Untersuchung der Hitzeempfindlichkeit der Agglutinine. Es zeigt sich, daß im 1 Stunde auf 70° erhitzten Kaninchenvirusserum alle Agglutinine unwirksam geworden sind.

Tabelle X.
Kaninchenvirusserum 1 Std. auf 70° erhitzt.

Bazillen	Serumverdünnung 1 : 100—1 : 10 000
HX 19	Alle negativ.
OX 19	
HX 2	
Gruppe III	
HX 19 52°	
„ 100°	
OX 19 52°	
„ 100°	

Die Gesamtergebnisse der Versuche sind weiter unten nochmals in der Tabelle XI zusammengestellt. Hier ist unter Verzicht auf die Titerwerte nur der positive und negative Ausfall der Reaktion verzeichnet. Die bisher unbekannt gewesenen Ergebnisse sind eingeklammert.

Tabelle XI.

Bazillen	Nicht erhitzte Sera					Erhitzte Sera				
	Pat.-Serum	HX 19-Serum	OX 19-Serum	Kan.-Virus-serum	HX 2-Serum	Pat.-Serum	HX 19-Serum	OX 19-Serum	Kan.-Virus-serum	HX 2-Serum
HX 19	f	f + g	f	f	g	0	g	0	0	g
OX 19	f	f	f	f	0	0	0	0	0	0
HX 2	±	g	0	0	g + f	0	g	0	0	g
Gruppe III	0	g	0	0	g	0	g	0	0	g
HX 19 52°	±	g	0	0	g	0	g	0	0	g
„ 100°	f	f	f	f	0	0	0	0	0	0
OX 19 52°	f	f	f	f	0	0	0	0	0	0
„ 100°	f	f	f	f	0	0	0	0	0	0

Die Tabelle läßt deutlich zwei Gruppen der Sera unterscheiden. Der Unterschied ist besonders markant nach Erhitzen der Sera auf 70°. Die Sera der ersten Gruppe, die durch den fetten Druck besonders hervorgehoben sind, sind nach dem Erhitzen völlig ohne agglutinierende Wirkung. Die Sera der zweiten Gruppe haben auch nach dem Erhitzen noch Agglutinine gegen vier der untersuchten Suspensionen. Die frischen Sera gruppieren sich ebenso. Die erste Gruppe ist gekennzeichnet durch das völlige Fehlen oder fast völlige Fehlen der Agglutinine für X 2, Proteus Gruppe III und HX 19 52°. Zur ersten Gruppe gehört das Fleckfieberkrankenserum, das Fleckfiebervirus-Kaninchenserum und das reine OX 19-Serum. Uebereinstimmung besteht innerhalb der ersten Gruppe auch noch im Typ der Agglutination. Die Sera enthalten nur feinflockende Agglutinine. Fleckfieberkranken- oder Fleckfieberkaninchensera, die auch grobflockende Agglutinine im Sinne von Weil und Felix besitzen, gibt es also nach den bisherigen Beobachtungen nicht.

Zur zweiten Gruppe gehören diejenigen Sera, die neben fein- auch grobflockende Agglutinine enthalten. Hierin beruht

der Unterschied gegenüber den Seris der ersten Gruppe. Nach Erhitzen auf 70° bleiben nur noch grobflockende Agglutinine übrig. Und da die grobflockenden Anteile der beiden Sera identisch sind, so ist das erhitzte HX 2-Immunserum von dem erhitzten HX 19-Immunserum nicht mehr zu unterscheiden. Wohl aber gelingt dies ohne weiteres bei den frischen Seris. Denn gegen die O-Form ist nur das X 19-Immunserum, nicht aber das X 2-Immunserum wirksam. Dagegen lassen sich die Sera der ersten Gruppe überhaupt nicht unterscheiden, während ihre Abgrenzung gegen ein HX 19-Immunserum oder X 2-Immunserum stets mit Leichtigkeit möglich ist.

Die Uebereinstimmung der Fleckfieberkrankensera und der Fleckfiebervirussera mit den Immunseris, die sich gegen die reine O-Form herstellen lassen, bleibt unverständlich, wenn wir das Zustandekommen der Weil-Felixschen Reaktion auf Grund der in der Einleitung erwähnten Hypothesen der Paragglutination, der Bildung von heterogenetischen Antikörpern oder mit einer anderen Hypothese, die die Abwesenheit der spezifischen X-Bazillen zur Voraussetzung hat, zu erklären suchen. Die tatsächlichen Verhältnisse sind dagegen ohne weiteres verständlich, wenn wir in Uebereinstimmung mit Weil-Felix, Friedberger usw. annehmen, daß im Fleckfieberkranken bzw. im Fleckfiebervirus die spezifischen X-Bazillen, und zwar in der O-Form vorhanden sind und als echtes Antigen die Antikörperbildung auslösen.

Damit wird des weiteren die Ansicht von Friedberger über die ätiologische Bedeutung des Bazillus von Weil-Felix für das Fleckfieber gestützt.

Zusammenfassung.

1) Durch Erhitzen des HX 19- und des HX 2-Kaninchenimmunserums 1 Stunde auf 70° werden die O-Agglutinine zerstört, die H-Agglutinine abgeschwächt. Demzufolge werden nur die H-Rezeptoren enthaltenden Bakterien agglutiniert, nämlich HX 19, HX 2, Gruppe III und HX 19 52°. Der Typ der Agglutination ist grobflockig (Tabelle II und IV).

2) Durch Erhitzen des OX 19-Kaninchenimmunserums („reines O-Serum“) und des Fleckfieberpatientenserums 1 Stunde auf 70° werden die ausschließlich vorhandenen O-Agglutinine zerstört. Demzufolge wird nichts agglutiniert (Tabelle VII und VIII).

3) Das Kaninchenvirusserum verhält sich sowohl im frischen wie im 1 Stunde auf 70° erhitzten Zustande genau wie ein OX 19-Kaninchenimmunserum oder Fleckfieberpatientenserum (Tabelle IX und X).

4) Nach den Agglutinationsbefunden lassen sich die fünf untersuchten Sera in zwei Gruppen scharf voneinander trennen: 1. Gruppe: OX 19-Kaninchenimmunserum, Fleckfieberkrankenserum, Kaninchenvirusserum. 2. Gruppe: HX 19- und HX 2-Kaninchenimmunserum.

5) Die Uebereinstimmung des Fleckfieberkranken- und Kaninchenvirusserums mit dem OX 19-Kaninchenimmunserum läßt sich nur so verstehen, daß im Fleckfieberkranken OX 19-Bazillen vorhanden sind, die als echtes Antigen die Antikörperbildung auslösen, eine weitere Stütze der Ansicht von Friedberger über die ätiologische Bedeutung des Bazillus OX 19 von Weil-Felix für das Fleckfieber.

[Aus der wissenschaftlichen Abteilung des Instituts für experim. Krebsforschung zu Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. H. Sachs).]

Ueber das Verhalten der Albumine und Globuline beim serologischen Luesnachweis.

Von **Hans Sahlmann.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 1. Juni 1921.)

Wenn auch das Wesen der bei Syphilis eintretenden charakteristischen Blutveränderungen bisher keineswegs völlig geklärt ist und dem Widerstreit der Meinungen noch in mancher Hinsicht Spielraum bleibt, so hat man doch in die Ursache des Zustandekommens der Komplementbindung bei der Wassermannschen Reaktion einen tieferen Einblick zu gewinnen vermocht. Immer mehr hat diejenige Auffassung an Wahrscheinlichkeit gewonnen, die zuerst von Sachs und Altmann[1]) geäußert worden ist, und nach der es sich bei der Wassermannschen Reaktion letzten Endes um eine Komplementinaktivierung handelt, wie sie auch beim Verdünnen im salzarmen Medium und bei Einwirkung anderer Faktoren eintritt. Die Komplementinaktivierung bei der Wassermannschen Reaktion kommt hiernach durch das in seinem allgemeinen Geltungsbereich von Friedemann[2]) hervorgehobene Prinzip der „antikomplementären Globulinwirkung" zustande, und man darf heute annehmen — eine Anschauung, die wohl auch derjenigen von P. Schmidt[3]) und Liebers[4]), Hirschfeld und Klinger[5]) u. a. entspricht —, daß durch das Zusammenwirken von Organextrakt und syphilitischem Serum diejenige Globulinveränderung ge-

1) H. Sachs und K. Altmann, Handb. d. pathog. Mikroorganismen (Kolle-Wassermann), 1. Aufl., 2. Erg.-Bd., 1909, p. 543.

2) U. Friedemann, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 67, 1910, p. 279.

3) P. Schmidt, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 69, 1911, p. 513.

4) M. Liebers, Arch. f. Hyg., Bd. 80, 1913, p. 29.

5) L. Hirschfeld und R. Klinger, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 21 1914, p. 40; Berl. klin. Wochenschr., 1914, No. 25.

schaffen wird, die zur antikomplementären Wirkung führt. Allerdings darf man den Bedingungen bei der Wassermannschen Reaktion in dieser Hinsicht eine Sonderstellung nicht mehr einräumen; denn auch bei der durch die spezifischen Antigen-Antikörperreaktionen bedingten Komplementbindung muß man heute, wie schon die Arbeiten von Friedemann (l. c.), Dean[1]) und anderen gezeigt haben, eine entsprechende Wirkungsart annehmen.

Freilich kann man bei der Wassermannschen Reaktion, wie auch bei den übrigen Komplementbindungsreaktionen, im Zweifel sein, ob die Globulinveränderung nur das als Komplementträger fungierende Meerschweinchenserum betrifft, oder ob sie bereits in dem syphilitischen Patientenserum bzw. im spezifischen Antiserum oder im Antigen zum Ausdruck kommt. Eine Entscheidung darüber, ob unter den Bedingungen der Wassermannschen Reaktion die antikomplementäre Wirkung nur durch die Alteration der Meerschweinchenserumglobuline bedingt wird, oder ob auch die Globuline des Patientenserums in diesem Sinne mitwirken, ist nicht ohne weiteres zu treffen. Wenn auch beim einfachen Digerieren des Patientenserums mit den für die Wassermannsche Reaktion geeigneten Organextrakten eine sichtbare Veränderung nicht einzutreten braucht, so ist doch zu berücksichtigen, daß gerade für die antikomplementäre Globulinwirkung Globulinveränderungen geringsten Grades hinreichen können, so daß auch beim Fehlen eines sichtbaren Ausdrucks die Veränderung in einem für die antikomplementäre Wirkung hinreichenden Grade eingetreten sein kann. Bei den neueren Flockungsreaktionen ist es allerdings durch die Verwendung geeigneter.Extrakte — der cholesterinierten Extrakte nach Sachs-Georgi, der Aetherrestextrakte aus Pferdeherzen nach Meinicke — gelungen, auch beim alleinigen Zusammenwirken von Extrakt und Luesserum ein sichtbares Präzipitat zu erzielen.

Der Annahme, daß es sich bei diesen Ausflockungen gewissermaßen um eine bis zur Sinnfälligkeit verstärkte Globulinveränderung handelt, scheinen neuere Angaben der Literatur zu widersprechen. Einerseits soll nach den Mitteilungen einer

1) H. R. Dean, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 13, 1912, p. 84.

Reihe von Autoren [Scheer[1]), Mandelbaum[2]), Niederhoff[3]), Epstein und Paul[4]) u. a.] der Niederschlag der für Syphilis charakteristischen Ausflockungsreaktion ganz oder im wesentlichen aus den Lipoiden des Organextraktes bestehen. Andererseits hat von verschiedenen Seiten aus in letzter Zeit die Frage im Vordergrund des Interesses gestanden, ob die bei der Ausflockung und auch bei der Wassermannschen Reaktion wirksamen Serumbestandteile an die Albumin- oder an die Globulinfraktion gebunden sind, wobei man vielfach dazu neigte, den Globulinen eine wesentliche Bedeutung abzusprechen.

So haben Gloor und Klinger[5]) darauf hingewiesen, daß die syphilitischen Sera bei der Wassermannschen Reaktion auch dann noch ausgesprochen positiv reagieren, wenn sie ihrer Globuline beraubt sind. Es handelt sich allerdings bei den Versuchen von Gloor und Klinger im wesentlichen um eine Gegenüberstellung der bei der Wassermannschen Reaktion charakteristisch wirksamen Stoffe und der durch künstliche Eingriffe (Schütteln, Digerieren mit Bakterien usw.) zu positiv reagierenden Flüssigkeiten umgewandelten Sera. Diese durch künstliche Eingriffe erzielten positiven Reaktionen sind aber, wie das schon Nathan[6]) im Anschluß an die Mitteilungen von Hirschfeld und Klinger[7]) hervorgehoben hat, lediglich an unspezifische Globulinveränderungen (Labilisierung der Globuline) gebunden. Dafür spricht besonders die von Nathan ermittelte Tatsache, daß die derart erzielte Reaktionsfähigkeit im Gegensatz zu der für Lues charakteristischen Eigenschaft des Serums thermolabil ist. In Uebereinstimmung damit erscheinen nun die neueren Angaben von Gloor und Klinger, daß die durch künstliche Eingriffe erzielten Qualitäten des Serums verschwinden, wenn die Globuline aus dem Serum entfernt werden, während die typische Reaktionsfähigkeit bei der Wassermannschen Reaktion noch mehr oder minder stark bestehen bleibt. Tatsächlich konnten Gloor und Klinger zeigen, daß die Sera beim Entfernen der Globuline durch Ausfällen mit $^{1}/_{300}$ Normal-Salzsäure nach dem Vorgange von Sachs und Altmann noch positiv reagieren, allerdings

---

1) K. Scheer, Münch. med. Wochenschr., 1921, No. 2.

2) M. Mandelbaum, Münch. med. Wochenschr., 1920, No. 33.

3) P. Niederhoff, Münch. med. Wochenschr., 1921, No. 11.

4) E. Epstein und F. Paul, Arch. f. Hyg., Bd. 90, 1921, p. 98.

5) W. Gloor und R. Klinger, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 29, 1920, p. 435.

6) E. Nathan, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 27, 1918, p. 227.

7) L. Hirschfeld und R. Klinger, a. a. O., und Biochem. Zeitschr., Bd. 70, 1915. p. 398.

dabei in ihrer Reaktionsfähigkeit abgeschwächt werden, wenn das Serum zuvor auf etwas höhere Temperatur (58 und 60°) erhitzt wurde. Gloor und Klinger schließen daraus, daß die eigentlichen syphilitischen Serumveränderungen keineswegs ausschließlich an die Globuline gebunden sind, sondern daß die Reaktion hier auf ausgesprochene chemische Affinitäten zurückzuführen ist, welche zwischen Eiweißteilchen und Extraktlipoiden besteht. Es muß allerdings hervorgehoben werden, daß Gloor und Klinger dabei den Globulinbegriff einschränken und unter Globulinen nur diejenige Eiweißfraktion des Serums verstehen, welche beim Verdünnen mit $^{1}/_{300}$ Normal-Salzsäure leicht ausfällt. Unter den so begrenzten Globulinbegriff fallen dabei nur die sog. Euglobuline, während die Pseudoglobuline ausgeschlossen sind. Im Gegensatz zum Verhalten bei der Wassermannschen Reaktion haben Gloor und Klinger bei der Sachs-Georgi-Reaktion nur bei einzelnen sehr stark positiven Seren nach Entfernung der Euglobuline positive Reaktion eintreten sehen. Gloor und Klinger kommen daher zu der Annahme, daß die Globuline für die Ausflockungsreaktion nötig sind, oder daß ihnen zum mindesten eine verstärkende Wirkung zukommt.

Viel weitgehender ist in seinen Schlußfolgerungen Mandelbaum[1]), der zur Globulinentfernung die Einleitung von Kohlensäure in das mit Aqua dest. verdünnte Serum nach dem Vorgang von Liefmann benutzt. Es handelt sich also auch in den Versuchen Mandelbaums nur um eine Entfernung der Euglobulinfraktion. In einem gewissen Gegensatz zu den Angaben von Gloor und Klinger stehen nun die Angaben Mandelbaums, nach denen die nach Entfernung der Euglobuline durch Kohlensäure erhaltene Restflüssigkeit aus aktiven Seris bei der Sachs-Georgi-Reaktion ebenso reagiert wie das native inaktivierte Serum. Bemerkenswert erscheint die weitere Angabe Mandelbaums, daß die durch Kohlensäurefällung erhaltenen Globulinsedimente nach Auflösung in physiologischer Kochsalzlösung in erhitztem und nicht erhitztem Zustande vollkommen unspezifische Reaktionen geben. Mandelbaum selbst bezeichnet das Ergebnis als um so auffälliger, „da sich die Euglobulinfraktionen aus wassermannpositiven und -negativen Seren nach ihrer Lösung und Erhitzung auf 56° absolut charakteristisch erweisen in bezug auf Wassermannsche Reaktion.“

Felke[2]) erhielt mit der von Gloor und Klinger benutzten Salzsäuremethode in den Restflüssigkeiten bei der Sachs-Georgi-Reaktion ebenso wie Mandelbaum nicht wesentlich schwächere Ausflockungen als mit den inaktiven nativen Seris; allerdings benutzte er andersartige Extrakte (Pferdeherzextrakte) wie Gloor und Klinger. Bei der Wassermannschen Reaktion behielten nach Felke stark positive Sera nach der Salzsäurefällung ihre Reaktionsfähigkeit, andere wiederum versagten. Den Grund für dieses Versagen glaubt Felke in einer störenden Interferenz der Globuline des Meerschweinchenserums erblicken zu müssen. Um diese auszuschalten,

1) M. Mandelbaum, Münch. med. Wochenschr., 1920, No. 33.
2) H. Felke, Münch. med. Wochenschr., 1920, No. 45.

gelangte er dazu, die Wassermannsche Reaktion mit aktiven, der Globuline beraubten Patientenseris anzustellen. Derartig vorbehandelte Sera enthalten noch die sog. „Endstückfunktion“ des Komplements, und Felke suchte dann die Komplementfunktion durch Zugabe persensibilisierten Blutes, d. h. der mit Globulinlösung vorbehandelten ambozeptorbeladenen roten Blutkörperchen, zu ergänzen. Es ergab sich auf diese Weise eine Modifikation der Wassermannschen Reaktion, die Felke als „Albumin-Endstück-Reaktion“ bezeichnet.

Uebereinstimmend ergibt sich also aus den angeführten Arbeiten eine mehr oder weniger große Neigung, den Globulinen eine wesentliche Rolle beim serologischen Syphilisnachweis abzusprechen. Man wird dabei allerdings zu berücksichtigen haben, daß es sich bei den Methoden, die zur Verwendung gelangten (Kohlensäure- und Salzsäurefällung), nur um eine Entfernung der Euglobuline, vielleicht auch nur eines leicht fällbaren Teiles von ihnen handelt.

Im Gegensatz zu den angeführten Befunden neuerer Autoren stehen nun die Ergebnisse älterer Arbeiten von Landsteiner und Müller[1]), Groß und Volk[2]), Bauer und Hirsch[3]), Elias, Neubauer, Porges und Salomon[4]), sowie von Friedemann[5]), nach denen das bei der Wassermannschen Reaktion wirksame Prinzip an die Globuline gebunden ist. In Uebereinstimmung mit ihnen steht eine neue Arbeit von Kapsenberg[6]) der auf Grund von Versuchen mit Ammonsulfatfällung allein den Globulinen die positive Reaktionsfähigkeit zuschreibt, während die Albumine negativ reagieren sollen. Bei der Dialyse des Serums dagegen, die den Methoden der Salzsäure- und Kohlensäurefällung nähersteht, erhielt er auch mit der Albuminfraktion positive Resultate, wobei allerdings die ausgefällten Globuline eher stärker reagierten. Mit Recht weist Kapsenberg darauf hin, daß das derartig erhaltene „Albumin“ als ein „positives Serum, vermindert um eine gewisse Menge seines Globulins“, zu bezeichnen ist.

Ganz abgesehen davon aber, wie man den Globulinbegriff in dem hier in Betracht kommenden Sinne umgrenzen will,

---

1) K. Landsteiner und R. Müller, Wien. klin. Wochenschr., 1908, p. 1076.

2) S. Groß und R. Volk, Wien. klin. Wochenschr., 1908, No. 18.

3) R. Bauer und A. Hirsch, Wien. klin. Wochenschr., 1910, No. 1.

4) H. Elias, E. Neubauer, O. Porges, H. Salomon, Wien klin. Wochenschr., 1908, No. 18.

5) U. Friedemann, l. c.

6) G. Kapsenberg, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 31, 1921, p. 301.

so erscheint doch der Gegensatz, der besonders zu den Angaben Mandelbaums besteht, offenkundig. Denn nach Mandelbaum soll ja der durch Kohlensäurewirkung erhaltene Globulinniederschlag bei der Sachs-Georgi-Reaktion überhaupt nicht oder nur unspezifisch reagieren. Da auf der anderen Seite aber auch zwischen den Angaben von Mandelbaum, Gloor und Klinger sowie Felke Widersprüche vorhanden sind, die der weiteren Aufklärung bedürftig erscheinen, so habe ich es unternommen, in vergleichenden systematischen Untersuchungen die durch Salzsäure- und Kohlensäurefällung erhaltenen Serumfraktionen zu analysieren. Ich habe die derart erhaltenen Serumkomponenten hauptsächlich mit Hilfe der Sachs-Georgischen Ausflockungsreaktion geprüft und dabei in Untersuchungen von mehr orientierendem Charakter auch die Wassermannsche Reaktion vergleichsweise herangezogen.

Methodisch bin ich folgendermaßen vorgegangen:

Zur Kohlensäuretrennung wurde ein Teil aktiven bzw. inaktiven Serums mit vier Teilen Aqua dest. verdünnt und sodann Kohlensäure bis zur maximalen Trübung durchgeleitet. Nach dem Zentrifugieren wurde der derart erhaltene Abguß (Albuminfraktion) mit 0,4 ccm 10-proz. Kochsalzlösung besalzen („Kohlensäurealbumin"), das Sediment mit 0,85-proz. Kochsalzlösung im allgemeinen auf das ursprüngliche Volumen entsprechend 5-fach verdünnten Serums aufgefüllt („Kohlensäureglobulin").

Bei der Salzsäurefällung wurde ein Teil Serum mit 8,2 Teilen $^1/_{250}$ Normalsalzsäure gemischt und das Gemisch nach einstündigem Stehen bei Zimmertemperatur zentrifugiert. Der Abguß wurde sodann mit 0,8 Teilen einer $^1/_{25}$ Normalnatronlauge in 10-proz. Kochsalzlösung neutralisiert und besalzen („Salzsäurealbumin"). Das Sediment wurde in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen, so daß die resultierende Lösung 10-fach verdünntem Serum entsprach („Salzsäureglobulin").

Die Ausflockungsmethode nach Sachs und Georgi wurde in der üblichen Weise ausgeführt, indem zwei Teile des Serums bzw. seiner Verdünnungen oder seiner Fraktionen mit einem Teil 6-fach verdünnten cholesterinierten Rinderherzextraktes über Nacht im Brutschrank gehalten wurden. In Kontrollversuchen wurden Serum bzw. seine Fraktionen mit 6-fach verdünntem Alkohol versetzt. Die Ablesung erfolgte im Agglutinoskop von Kuhn-Woithe; das Ergebnis wurde mit +++, ++, +, ±, ∸ bezeichnet.

Auch die Ausführung der Wassermannschen Reaktion erfolgte in der üblichen Weise unter Benützung cholesterinierter Rinderherzextrakte.

Zu meinen eigenen Versuchen bediente ich mich zunächst wegen der gleichmäßigeren Dosierbarkeit der Salzsäuretrennungsmethode. Dabei ergab sich nun, daß keineswegs allein die Albuminfraktion, sondern auch die Globulinfraktion positiv reagierte und letztere in manchen Fällen sogar stärker als die Albuminfraktion, wie es folgendes Versuchsbeispiel zeigt:

Je 0,5 ccm von drei positiven, aktiven Patientenseris (a—c) wurden mit je 4,1 ccm einer $^1/_{250}$ n. Salzsäure (in Aqua dest.) eine Stunde lang digeriert. Nach dem Zentrifugieren wurde

I. der Abguß mit 0,4 ccm $n/_{25}$ Natronlauge (in 10-proz. Kochsalzlösung) versetzt (HCl-Albumin),

II. das Sediment in 0,85-proz. Kochsalzlösung so aufgenommen, daß die Konzentration einer 10-fachen Serumverdünnung entsprach (HCl-Globulin).

Absteigende Mengen der derart erhaltenen Fraktionen (Vol. 0,5 ccm) wurden mit je 0,25 ccm 6-fach verdünnten cholesterinierten Rinderherzextrakts gemischt (Gesamtvolumen 0,75 ccm).

Das nach 24 Stunden Brutschrankaufenthalt abgelesene Ergebnis zeigt Tabelle I.

Tabelle 1.

HCl-Albumin bzw. Globulin	Ausflockung beim Mischen von cholest. Rinderherzextrakt mit					
	I. HCl-Albumin aus Serum			II. HCl-Globulin aus Serum		
ccm	a) positiv	b) positiv	c) positiv	a) positiv	b) positiv	c) positiv
0,5	++	+++	+++	++	+++	+++
0,25	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0.125	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0,0625	+++	++	+(+)	+++	++	++
0,025	+	±	+	+++	+	++
0	—	—	—	—	—	—
	Kontrollen unter Ersatz des Organextraktes durch Alkohol					
0,5	—	—	—	—	—	—
0,25	—	—	—	—	—	—

Die Tabelle zeigt zunächst, daß die durch Salzsäureällung erhaltene Albuminfraktion in Uebereinstimmung mit den Angaben von Gloor und Klinger, Mandelbaum, Felke bei der Ausflockungsreaktion positiv reagiert, obwohl die aktiven Sera im nativen Zustand eine Ausflockung zum Teil vermissen ließen. Im Gegensatz zu den von Mandelbaum bei der Kohlensäurefällung erhaltenen Ergebnissen zeigt sich aber, daß auch

die durch Salzsäuretrennung erhaltene Globulinfraktion eine positive Ausflockung gibt, und zwar in dem vorliegenden Versuchsbeispiel sogar noch in größerer Stärke als die Albuminfraktion.

Ich möchte jedoch auf diese quantitativen Unterschiede keinen besonderen Wert legen. Einerseits waren sie nicht immer ausgesprochen vorhanden, andererseits dürfte die Möglichkeit nicht auszuschließen sein, daß durch die Salzsäureeinwirkung eine Abschwächung der Reaktionsfähigkeit in der Albuminfraktion entstanden ist, oder daß nach dem Neutralisieren infolge der vorher an die Globuline gebundenen Salzsäurequote ein Alkaliüberschuß interferiert, wie das Gloor und Klinger annehmen. Bemerkenswert scheint mir aber jedenfalls die Tatsache zu sein, daß die erhaltene Globulinfraktion keineswegs der ausflockenden Fähigkeit entbehrt. Daß es sich auch bei den Salzsäureglobulinen um eine charakteristische Reaktion handelte, zeigten zahlreiche Versuche mit negativen Seris, bei denen weder die mit Salzsäurefällung erhaltenen Albumine noch die Globuline eine Ausflockung aufwiesen.

Wenn sich daher bei dem verhältnismäßig leichten Eingriff der Fällung mit verdünnter Salzsäure[1]) die so erhaltenen Globuline zur Ausflockung eignen, so darf man wohl schon daraus folgern, daß der Euglobulinfraktion keineswegs das Ausflockungsvermögen fehlt. Wie sind aber dann die völlig negativen Resultate zu erklären, die Mandelbaum bei der Kohlensäurefällung erhalten hat? Man wird wohl ohne weiteres berücksichtigen müssen, daß die Kohlensäurefällung einen noch schwächeren Eingriff darstellt, als die Salzsäurefällung. Immerhin dürfte es aber merkwürdig erscheinen, wenn mit der Kohlensäurefällung die Globuline überhaupt frei von fällender Wirkung erhalten würden.

---

1) Allerdings bin ich mir wohl bewußt, daß im Gegensatz zu Gloor und Klinger sowie Felke, die $^1/_{300}$ Normalsalzsäure zur Fällung benutzten, in meiner Versuchsanordnung eine etwas stärkere Salzsäurekonzentration ($^1/_{250}$ Normalsalzsäure) interferiert.

Nun hat Mandelbaum, soweit es sich aus seinen Angaben entnehmen läßt, die Prüfung der durch Kohlensäurefällung erhaltenen Globuline mit verhältnismäßig großen Mengen und in einer außerordentlich hohen Konzentration ausgeführt. Er löste das Kohlensäuresediment nur in so viel physiologischer Kochsalzlösung, daß das erhaltene Volumen der ursprünglichen Serummenge entsprach. Die Konzentration der derart erhaltenen Globulinlösungen war also dieselbe, wie die in den unverdünnten nativen Seris. Es erscheint denkbar, daß bei derartig starker Konzentration, die ja die von Sachs und Georgi vorgeschriebene um das Vielfache übertrifft, uncharakteristische Ausflockungen entstehen könnten, während bei kleineren Mengen und geringerer Konzentration die Reaktion wieder ihr für Syphilis charakteristisches Gepräge annimmt.

Ich habe daher die Versuchsanordnung Mandelbaums derart modifiziert, daß ich beide Komponenten, sowohl das durch Kohlensäurefällung erhaltene Albumin als auch das Kohlensäureglobulin in absteigenden Mengen auf seine Ausflockungsfähigkeit prüfte, dabei aber zunächst von starken Konzentrationen nach den Angaben Mandelbaums ausging. Das Ergebnis zeigt folgendes Versuchsbeispiel.

Je 2 ccm aktiven, wassermannpositiven (a) und wassermannnegativen (b) Patientenserums wurden mit je 8 ccm Aqu. dest. versetzt und nach dem Einleiten von Kohlensäure zentrifugiert:

I. Das so erhaltene Kohlensäure-„Albumin“ wurde mit 0,8 ccm 10-proz. Kochsalzlösung besalzen.

II. Das erhaltene Sediment wurde in 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst und nach dem Vorgange von Mandelbaum nach einstündigem Stehen bei Zimmertemperatur nochmals scharf zentrifugiert[1]).

Absteigende Mengen der derart dargestellten Kohlensäurealbumine (I) und Kohlensäureglobuline (II) wurden mit physiologischer Kochsalzlösung auf ein Volumen von von je 0,5 ccm gebracht. Die mit je 0,25 ccm 6-fach

1) Es muß erwähnt werden, daß sich bei Herstellung der konzentrierten Sedimentlösungen nicht immer das ganze Sediment in den geringen Mengen physiologischer Kochsalzlösung löste. Es war daher auch nach den Angaben Mandelbaums um so nötiger, nachträglich nochmals zu zentrifugieren und nur ganz klare Lösungen zu verwenden, um zu vermeiden, daß ungelöste Sedimentbestandteile bei der Flockung uncharakteristische Reaktionen vortäuschten.

verdünnten cholesterinierten Rinderherzextraktes beschickten Röhrchen kamen über Nacht in den Brutschrank.

Das am nächsten Tage abgelesene Ergebnis zeigt Tabelle II.

Tabelle II.

$^1/_5$ CO_2-Albumin bzw. $^1/_1$ CO_2-Globulin ccm	Ausflockung beim Mischen von cholesteriniertem Rinderherzextrakt mit			
	I. CO_2-Alb. = $^1/_5$ Serum		II. CO_2-Glob. = $^1/_1$ Serum	
	a) positiv	b) negativ	a) positiv	b) negativ
0,5	+++	—	±	—
0,25	+++	—	±	—
0,125	+++	—	±	—
0,0625	+++	—	+++	—
0,025	+++	—	+	—
0	—	—	—	—
	Kontrollen unter Ersatz des Organextraktes durch Alk.			
0,5	—	—	±	—
0,25	—	—	—	—

In der vorangehenden Tabelle entspricht die oberste Querkolonne der Versuchsanordnung Mandelbaums, und sie bestätigt durchaus das von Mandelbaum mitgeteilte Ergebnis. In den hier in Betracht kommenden Mengen reagiert in der Tat nur der Kohlensäureabguß, nicht das Kohlensäuresediment positiv; denn die schwache Reaktion, die mit der Menge von 0,5 ccm Kohlensäureglobulin eintritt, ist in gleicher Weise auch in der unten angeführten Kontrolle bei Ersatz des Organextraktes durch Alkohol vorhanden. Dagegen zeigt der von mir angeführte Versuch bei geringeren Mengen von Kohlensäureglobulin eine typische und charakteristische Ausflockung. Schon aus dem vorliegenden Versuch kann man allerdings den Schluß ziehen, daß die Ausflockungsstärke des Kohlensäureglobulins diejenige des Kohlensäurealbumins nicht erreicht. Denn obwohl das Globulin 5-fach konzentrierter ist als das Albumin, zeigt sich bei den geringsten Mengen bereits ein Unterschied zugunsten des letzteren. Die quantitative Differenz, die sich daher im Vergleich zu den in Tabelle I angeführten Salzsäureversuchen ergibt, dürfte aber verständlich sein, wenn man annimmt, daß die Einleitung von Kohlensäure in das mit Wasser verdünnte Serum wohl einen geringgradigeren fällenden Ein-

griff darstellt, als die Verdünnung des Serums mit $^1/_{250}$ Normalsalzsäure.

Es ergibt sich mithin jedenfalls, daß bei der Kohlensäurefällung im Gegensatz zu den Angaben Mandelbaums für Syphilis charakteristische Stoffe in den Globulinniederschlag gehen können, wenn sie dabei auch in letzterem in geringerer Wirksamkeit auftreten als bei der Salzsäurefällung. Um diese Unterschiede genauer erkennen zu können, habe ich eine größere Anzahl von Seris vergleichend mit der Kohlensäure- und Salzsäurefällungsmethode geprüft, wobei ich mich aber damit begnügte, das Kohlensäuresediment, ebenso wie das Salzsäuresediment in einer größeren Menge physiologischer Kochsalzlösung aufzunehmen, und zwar in einer Menge, wie sie der Albuminverdünnung entspricht. Ein Versuchsbeispiel dieser Art zeigt Tabelle III.

Tabelle III.

HCl- ($^1/_{10}$) u. CO_2- ($^1/_5$) Albumin bzw. Globulin	Ausflockung beim Mischen von cholesteriniertem Rinderherzextrakt mit absteigenden Mengen											
	a) HCl-Albumin aus Serum			b) HCl-Globulin aus Serum			c) CO_2-Albumin aus Serum			d) CO_2-Globulin aus Serum		
ccm	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
0,5	+++	+++	+++	±	++	+++	+++	+++	+++	—?	+++	±
0,25	+++	++	+++	+++	±	+++	+++	+++	+++	—?	++	±
0,125	++	+	+++	+++	—	+++	+++	+++	+++	—	±	+(+)
0,0625	±	—	++	++	—	++	++	++	+++	—	—	—
0,025	—	—	+	—	—	++	—	—	++	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Das scheinbar regellose Bild, das dieses Versuchsbeispiel und auch andere Versuche aufwiesen, läßt sich leicht zu einiger Gesetzmäßigkeit ordnen. Es ergibt sich nämlich:

I. Die Salzsäurealbumine wirken regelmäßig bei der Ausflockung mehr oder minder stark.

II. Die Salzsäureglobuline wirken bei der Ausflockung regelmäßig und in quantitativer Hinsicht bald ebenso stark und stärker, häufig aber auch schwächer als die Salzsäurealbumine.

III. Die Kohlensäureglobuline wirken gesetzmäßig schwächer als die Albumine; sie lassen nicht selten eine Wirkung überhaupt vermissen.

Wenn man diese Befunde zusammenfaßt, so ergibt sich jedenfalls, daß das Salzsäuretrennungsverfahren in bezug auf die Funktion der dabei erhaltenen Globuline bei der Ausflockung grundsätzlich anders wirkt, als die Kohlensäuretrennung. Man kann die Ursache hierfür einerseits, wie schon erwähnt, in einer quantitativ stärkeren Globulinfällung durch verdünnte Salzsäure erblicken. Es wäre aber auch möglich, daß die Salzsäure auf gewisse Faktoren, die sich in der Globulinquote befinden, und die die Ausflockungsreaktion hemmen, inaktivierend wirkt. Eine derartige Säurewirkung ist durchaus denkbar. Es sei an frühere Untersuchungen von Sachs[1]), Ritz und Nathan[2]) erinnert, aus denen sich ergab, daß das komplementhaltige Meerschweinchenserum durch Salzsäureeinwirkung, ohne seinen Komplementgehalt zu verlieren, so verändert wird, daß es gewissen inaktivierenden Einflüssen gegenüber (Komplementinaktivierung im salzarmen Medium, durch Kobragift, Bakterien usw.) resistent wird. Wenn man diese Erfahrungen auf die hier zu erörternde Frage überträgt, so könnte man annehmen, daß durch Salzsäureeinwirkung hemmende Faktoren beseitigt werden, die im Globulin die Wirkung der darin enthaltenen, für Syphilis charakteristischen Struktur nicht in Erscheinung treten lassen. Die bei der Ausflockung charakteristisch wirksamen Bestandteile wären also dem Komplement in den angeführten älteren Versuchen vergleichbar, und sie würden ebenso wie das Komplement durch Salzsäurewirkung hemmenden Einflüssen entzogen werden.

Die hier entwickelte Hypothese würde also bedeuten, daß der durch Kohlensäurefällung erhaltene Globulinniederschlag nicht deshalb in manchen Fällen bei der Ausflockung unwirksam ist, weil die reaktionsfähigen Komponenten fehlen, sondern deshalb, weil er durch die gleichzeitige Anwesenheit von hemmenden Stoffen an seiner Wirkung ge-

---

1) H. Sachs und H. Ritz, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 26, 1917, p. 483.

2) E. Nathan, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 26, 1917, p. 503.

hindert wird[1]). Wenn dem aber so ist, so war zu erwarten, daß die nicht oder wenig wirksamen Kohlensäureglobuline auch einen hemmenden Einfluß bei der typischen Versuchsanordnung der Sachs-Georgi-Reaktion ausüben würden.

Ich habe daher zunächst die Kohlensäuresedimente aus negativen aktiven Seris in bezug auf ihren Einfluß auf die Sachs-Georgi-Reaktion geprüft und bringe im folgenden ein Versuchsbeispiel dieser Art.

Das Kohlensäureglobulin, das aus aktivem negativem Serum in der üblichen Weise gewonnen worden war, wurde in so viel physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen, daß die Lösung 5-fach verdünntem Serum entsprach.

Absteigende Mengen dieser Kohlensäureglobulinlösung (Vol. 0,5 ccm) wurden in 3 Parallelreihen mit je 0,1 ccm 2-fach verdünnten inaktivierten

a) massermannpositiven,
b) wassermannpositiven,
c) wassermannnegativen

Serums unter Zusatz von 0,25 ccm 6-fach verdünnten cholesterinierten Rinderherzextrakts über Nacht im Brutschrank gelassen. Das Resultat zeigt Tabelle IV.

Tabelle IV.

CO_2-Globulin = $^1/_5$ Serum ccm	Ausflockung beim Mischen von cholesteriniertem Rinderherzextrakt mit absteigenden Globulinmengen und je 0,05 ccm inaktivierten Patientenserums		
	a) positiv	b) positiv	c) negativ
0,5	±	—	—
0,25	—	—	—
0,125	—	±	—
0,0625	+	+	—
0,025	+++	++	—
0	+++	+++	—

Wie die Tabelle zeigt, sind die aus aktivem negativem Serum gewonnenen Kohlensäureglobuline imstande, die Ausflockung, die beim Zusammenwirken von cholesteriniertem Rinderherzextrakt und inaktiviertem Patientenserum eintritt, we-

---

1) Die aus den vorangehenden Tabellen ersichtliche Tatsache, daß die Globulinfraktionen zuweilen in geringeren Dosen stärker wirken als in größeren, dürfte bereits in diesem Sinne sprechen.

s e n t l i c h z u h e m m e n b z w. a u f z u h e b e n. Dabei bestand zwischen den aus wassermannnegativen und wassermannpositiven Seris erhaltenen Kohlensäuresedimenten kein prinzipieller Unterschied. So zeigt auch das in Tabelle V wiedergegebene Versuchsbeispiel, das in seiner Anordnung der Tabelle IV entspricht, durchaus die nämlichen Verhältnisse. Es wirkten hier die aus verschiedenen Seris gewonnenen Kohlensäuresedimente mit einem einheitlichen positiven inaktivierten Serum zusammen.

Tabelle V.

CO_2-Globulin (= $1/5$ Serum)	Ausflockung beim Mischen von cholesteriniertem Rinderherzextrakt mit 0,05 ccm inaktiviertem pos. Patientenserum und absteigenden Globulinmengen aus den Seris			
ccm	a) negativ	b) positiv	c) positiv	d) positiv
0,5	—	—	—	—
0,25	—	—	—	—
0,125	+	—	—	—
0,0625	+++	+	+	+
0,025	+++	+++	+++	+++
0	+++	+++	+++	+++

Wie die Tabelle zeigt, s i n d d i e K o h l e n s ä u r e g l o b u l i n e r e g e l m ä ß i g b e f ä h i g t, d i e t y p i s c h e A u s f l o c k u n g s r e a k t i o n m i t i n a k t i v i e r t e m S e r u m z u h e m m e n. Die Versuche sprechen also tatsächlich in dem oben erörterten Sinne, d a ß i n d e n K o h l e n s ä u r e g l o b u l i n e n h e m m e n d e F a k t o r e n v o r h a n d e n s i n d, die möglicherweise eine in ihnen enthaltene Reaktionsfähigkeit larvieren können.

Es ergab sich nun bei weiteren Untersuchungen die Tatsache, daß die in den Kohlensäuresedimenten enthaltenen Hemmungsstoffe thermolabil sind und zerstört werden, wenn man die aus aktiven Seris gewonnenen Kohlensäuresedimente nach ihrer Lösung in physiologischer Kochsalzlösung inaktiviert, d. h. $1/2$ Stunde auf 56^0 erhitzt.

Absteigende Mengen von Kohlensäureglobulin, entsprechend 5-facher Serumverdünnung, wurden

I. im nativen Zustand,

II. nach $1/2$-stündigem Erhitzen auf 55^0 in je 2 Parallelreihen mit je 0,1 ccm 2-fach verdünnten positiven inaktivierten Patientenserums unter

Zusatz von je 0,25 ccm 6-fach verdünnten cholesterinierten Rinderherzextrakts über Nacht im Brutschrank gelassen.

Das nach 24-stündigem Brutschrankaufenthalt abgelesene Ergebnis zeigt Tabelle VI.

Tabelle VI.

CO_2-Globulin (a u. b) = $^1/_5$ Serum	Ausflockung beim Mischen von chol. Rinderherzextrakt mit 0,05 ccm inaktiviertem positiven Patientenserum und absteigenden Mengen Globulin			
	I. Globulinlösung im nativen Zustand		II. Globulinlösung nach $^1/_2$-stünd. Erhitzen auf 56°	
ccm	a) positiv	b) positiv	a) positiv	b) positiv
0,5	—	—	+++	+++
0,25	—	—	+++	+++
0,125	±	—	+++	+++
0,0625	+++	±	+++	+++
0,025	+++	+++	+++	+++
0	+++	+++	+++	+++

Die Tabelle ergibt, daß die Kohlensäureglobulinlösungen durch das vorherige Inaktivieren bei der Reaktion nach Sachs-Georgi ihre hemmenden Wirkungen einbüßen. Es handelt sich also um eine thermolabile Funktion, und man wird daher in der Annahme nicht fehlgeben, daß sie ein Ausdruck der Labilität der durch Kohlensäure gefällten Globuline ist.

Wenn dem so ist, so war vorauszusehen, daß die Hemmungswirkung den nach Entfernung der Globuline durch Kohlensäurefällung verbleibenden Albuminfraktionen nicht zukommt, während im nativen aktiven Serum immerhin eine gewisse, wenn auch wechselnde Hemmung erwartet werden konnte, ähnlich wie Neukirch [1]) durch zahlreiche Untersuchungen feststellen konnte, daß aktives Meerschweinchenserum hemmend auf den Flockungsvorgang wirkt. Ich habe daher eine Reihe aktiver Sera derart untersucht, daß ich sie einerseits im nativen Zustande, anderseits nach Trennung der Albumine und Globuline durch Kohlensäurespaltung auf ihre Eignung, die typische Ausflockungsreaktion mit inaktivem positivem Serum zu hemmen, prüfte.

1) P. Neukirch, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 29, 1920, p. 177.

Absteigende Mengen von
I. 5-fach verdünntem, aktivem, negativem Patientenserum,
II. den daraus gewonnenen Kohlensäurealbuminen,
III. den daraus gewonnenen Kohlensäureglobulinen, die in ihrer Konzentration der Serumverdünnung entsprachen, wurden in zwei Parallelreihen mit je 0,1 ccm 2-fach verdünnten inaktivierten, wassermannpositiven (a und b) Patientenserums gemischt und unter Zusatz von je 0,25 ccm des 6 fach verdünnten cholesterinierten Rinderherzextraktes über Nacht im Brutschrank gelassen.

Das Ergebnis zeigt Tabelle VII.

Tabelle VII.

Natives Serum bzw. CO_2-Album. u. Globulin = $^1/_5$ Serum ccm	Ausflockung beim Mischen von chol. Rinderherzextrakt mit 0,05 ccm der inaktivierten, positiven Patientensera (a und b) und absteigenden Mengen von					
	I. nativem Serum		II. CO_2-Albumin		III. CO_2-Globulin	
	a	b	a	b	a	b
0,5	++	+	+++	+++	—	—
0,25	+++	++	+++	+++	—	—
0,125	+++	+++	+++	+++	+	++
0,0625	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0,025	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Die Tabelle bestätigt zunächst in Teil III, daß die Kohlensäureglobuline die Ausflockungsreaktion hemmen. Teil II zeigt, daß den nach der Kohlensäurefällung erhaltenen Albuminen, wie zu erwarten war, jeglicher Einfluß auf die Ausflockung fehlt. Teil I der Tabelle zeigt das Verhalten des aktiven Serums. Eine hemmende Wirkung ist hier nur in geringem Grade vorhanden, und sie kann augenscheinlich, je nach der Ausflockungsstärke des verwendeten Serums mehr oder weniger variieren. Daß der hemmende Einfluß nicht so stark zum Ausdruck kommt, wie er im Kohlensäureglobulin nachzuweisen ist, kann nicht überraschen, da ja hierbei sicherlich die antagonistische Funktion der Albumine zu berücksichtigen ist.

Wenn nun tatsächlich das Ausbleiben der Flockung im Kohlensäureglobulin durch die Interferenz antagonistischer Faktoren vorgetäuscht wird und die letzteren, wie wir gesehen haben, thermolabil sind, so war zu erwarten, daß durch nach-

trägliches Inaktivieren der durch Kohlensäurefällung erhaltenen Globulinlösungen auch die Reaktionsfähigkeit bei der Ausflockung wieder restituierbar ist, und daß unter Umständen die aus zuvor inaktiviertem Serum durch Kohlensäurefällung erhaltenen Globuline im Gegensatz zu den aus aktivem Serum gewonnenen ausflockend wirken. Daß der Versuch in der Tat diesen Erwartungen entsprechen kann, zeigt das nachfolgende Versuchsbeispiel (Tabelle VIII).

Tabelle VIII.

CO_2-Globulin (= 1/5 Serum) ccm	Ausflockung beim Mischen von cholesteriniertem Rinderherzextrakt mit		
	I. CO_2-Globulin aus aktivem Serum	II. CO_2-Globulin später inaktiviert	III. CO_2-Globulin aus inaktivem Serum
0,5	—	+++	+++
0,25	—	+++	+++
0,125	—	+++	+++
0,0625	—	+++	++
0,025	—	—	—
0	—	—	—

Nach der vorstehenden Tabelle gelingt es also, das an und für sich des Flockungsvermögens entbehrende Kohlensäureglobulin durch Inaktivieren flockungsfähig zu machen, und ebenso übt das aus inaktiviertem Serum durch Kohlensäurefällung erhaltene Globulin die Ausflockung aus. Wenn auch die Versuche nicht immer in dem hier verzeichneten quantitativen Ausmaße ausfielen, so darf man doch aus einem derartigen Versuchsbeispiel den Schluß ziehen, daß in der durch Kohlensäurefällung erhaltenen Globulinlösung ausflockende und hemmende Substanzen enthalten sind, und daß die letzteren ihren antagonistischen Einfluß durch das Inaktivieren verlieren.

Allerdings steht dieses Ergebnis bis zu einem gewissen Grade im Gegensatz zu den Angaben Mandelbaums. Denn nach Mandelbaum sollen die durch Kohlensäurefällung aus aktivem oder inaktivem Serum erhaltenen Globuline, gleichgültig ob sie ohne weiteres nach der Lösung zur Untersuchung gelangen oder zuvor inaktiviert werden, völlig uncharakteristisch bei der Sachs-Georgischen Ausflockungsmethode

reagieren. Wodurch der Gegensatz bedingt ist, entzieht sich meiner Beurteilung. Vielleicht ist aber doch der schon erwähnte Umstand zu berücksichtigen, daß Mandelbaum die Globulinlösungen nur in den größten Mengen untersucht hat. Denn auch ich bekam häufig bei der Untersuchung der Globulinlösungen in größten Dosen unspezifische Reaktionen. Ich lasse ein Versuchsbeispiel folgen, in dem ich die Kohlensäureglobuline aus inaktiviertem Serum darstellte.

Kohlensäureglobuline wurden aus einer Reihe verschiedener inaktivierter Patientensera in üblicher Weise gewonnen und in so viel Kochsalzlösung nach dem Vorgange von Mandelbaum aufgenommen, daß die Konzentration unverdünntem Serum entsprach.

Absteigende Mengen dieser Globulinlösungen (Volumen 0,5) wurden mit je 0,25 ccm 6-fach verdünnten cholesterinierten Rinderherzextrakts gemischt.

Nach 24-stündigem Brutschrankaufenthalt war das Ergebnis folgendes.

Tabelle IX.

Mengen des CO_2-Glob. ccm	Ausflockung bei Mischen von cholesteriniertem Rinderherzextrakt mit absteigenden Mengen CO_2-Globulin aus inaktivierten Seris										
	a pos.	b pos.	c pos.	d pos.	e neg.	f neg.	g neg.	h neg.	i neg.	k neg.	l neg.
0,5	+++	+++	+++	—	+	+++	+++	+++	+	±	—
0,25	+++	+++	+++	—	±	++	+	+	±	—	—
0,125	+++	+++	+	—	—	—	—	—	—	—	—
0,0625	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,025	+++	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Kontrolle bei Ersatz des Extraktes durch Alkohol										
0,5	+	—	±	—	—	±	±	+	—	—	—
0,25	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Wie die Tabelle zeigt, ist das Verhalten der einzelnen Kohlensäureglobuline in den größten Mengen (oberste Reihe) völlig uncharakteristisch. Sowohl negative Globuline können positiv reagieren, als auch positive unter Umständen negativ. Zur Deutung ist aber einerseits zu berücksichtigen, daß diese stark konzentrierten Globulinlösungen zuweilen, wie die Tabelle zeigt, bereits beim Zusatz von verdünntem Alkohol Eigenflockung aufweisen. Dann aber zeigt sich, daß in geringeren Mengen der Globulinlösungen (dritte und untere Querreihen) das Verhalten der Ausflockung ein charakteristisches

Gepräge wiedergibt. Wir werden also kaum fehlgehen in der Annahme, daß das uncharakteristische Verhalten der Kohlensäureglobuline, über das Mandelbaum berichtet, wenigstens zu einem wesentlichen Teil durch die großen Globulinmengen bedingt ist, die Mandelbaum verwendet hat. Daß hier ein charakteristisches Gepräge für Syphilis nicht mehr besteht, ist um so weniger verwunderlich, als auch das native Serum bei derart hohen Serummengen unspezifische Reaktionen aufweisen kann. Man wird aber, wie meine Versuche zeigen, daraus nicht den Schluß ziehen dürfen, daß das Verhalten der Globuline bei der Ausflockungsreaktion schlechtweg als uncharakteristisch zu bezeichnen ist.

Im übrigen wird man eben zu berücksichtigen haben, daß die durch Kohlensäurefällung erhaltenen Globuline die Ausflockungsreaktion mehr oder weniger zu hemmen vermögen. Diese Eigenschaften teilen die aus menschlichem Serum gewonnenen Globuline übrigens mit den aus tierischen Seris gewonnenen Globulinlösungen, wie es folgender Versuch zeigt.

Durch Kohlensäurefällung wurden Globuline
a) aus aktivem Menschenserum,
b) aus aktivem Meerschweinchenserum,
c) aus aktivem Kaninchenserum,
d) aus aktivem Hammelserum
hergestellt.

Absteigende Mengen der mit physiologischer Kochsalzlösung (entsprechend 5-facher Serumverdünnung) aufgenommenen Globuline wurden mit je 0,1 ccm zweifach verdünntem, inaktiviertem, positivem Patientenserum unter Zusatz von 0,25 ccm 6-fach verdünnten cholesterinierten Rinderherzextrakts gemischt.

Das nach 24-stündigem Brutschrankaufenthalt abgelesene Ergebnis zeigt Tabelle X.

Die Tabelle zeigt, daß auch die aus tierischen Seris gewonnenen Globuline die Ausflockungsreaktion hemmten. Daß die Hemmung beim Hammelserum (d) nicht so deutlich in Erscheinung trat, ist daran gelegen, daß die aus Hammelserum gewonnenen Globuline eine mehr oder weniger starke Eigenflockung aufwiesen.

Es erscheint nun noch der Erklärung bedürftig, wieso die mit der Salzsäuretrennungsmethode erhaltenen Globuline

Tabelle X.

CO_2-Globulin = 1/5 Serum ccm	Ausflockung bei Mischen von cholesteriniertem Rinderherzextrakt mit je 0,05 ccm inaktiviertem, positivem Patientenserum und absteigenden Globulinmengen aus			
	a Menschenserum	b Meerschweinchenserum	c Kaninchenserum	d Hammelserum
0,5	±	+	±	++
0,25	±	+++	++	+++
0,125	+++	+++	+++	+++
0,0625	+++	+++	+++	+++
0,025	+++	+++	+++	+++
	Kontrolle bei Ersatz des Extraktes durch Alkohol			
0,5	—	—	±	+++
0,25	—	—	—	—

regelmäßiger das Flockungsvermögen aufwiesen als die mit dem Kohlensäureverfahren erhaltenen Globuline. Es liegt dabei von vornherein nahe, anzunehmen, daß die durch Salzsäurefällung erhaltenen Globuline im Gegensatz zu den Kohlensäureglobulinen die Ausflockungsreaktion mit inaktiviertem Serum nicht hemmen. Ich habe daher aus negativem menschlichen Blutserum die Globuline sowohl mit der Kohlensäure- als auch mit der Salzsäuremethode gewonnen und sie vergleichend auf ihren Einfluß gegenüber der Ausflockungsreaktion geprüft.

Aus aktiven negativem Serum wurden

I. Kohlensäureglobuline,

II. Salzsäureglobuline

gewonnen. Die Globuline wurden in so viel Kochsalzlösung aufgenommen, daß die Lösung bei I. 5-fach verdünntem, bei II. 10-fach verdünntem Serum entsprach. Sodann wurden absteigende Mengen dieser Globuline (0,5 ccm Volumen) mit je 0,1 ccm 2-fach verdünntem wassermannpositiven Patientenserum (a und b) unter Zusatz von je 0,25 ccm 6-fach verdünntem Rinderherzextrakt gemischt.

Das nach 24-stündigem Brutschrankaufenthalt abgelesene Ergebnis zeigt Tabelle XI.

Wie die Tabelle zeigt, üben die Salzsäureglobuline im Vergleich zu den Kohlensäureglobulinen nur eine minimale Hemmungswirkung aus, und man wird daher in der Annahme nicht fehlgehen, daß durch diesen Mangel an Hemmungsvermögen die aus positiven Seris durch

Tabelle XI.

Globulin = $^1/_5$ bzw. $^1/_{10}$ Serum ccm	Ausflockung beim Mischen von cholesteriniertem Rinderherzextrakt mit absteigenden Globulinmengen und je 0,05 ccm der inaktiven positiven Patientensera a und b			
	I. Kohlensäureglobuline		Salzsäureglobuline	
	a	b	a	b
0,5	—	—	++	+
0,25	—	±	++	++
0,125	+	+	+++	+++
0,0625	+++	++	+++	+++
0,025	+++	+++	+++	+++
0	+++	+++	+++	+++

Salzsäurefällung erhaltenen Globuline regelmäßigeres Ausflockungsvermögen ausüben, als die Kohlensäureglobuline. Was die Ursache dieses Unterschiedes anlangt, so liegt es nahe, anzunehmen, daß durch die Stärke der Salzsäurewirkung die Globuline so verändert („stabilisiert“) werden, daß ihr Hemmungsvermögen eine erhebliche Verminderung oder Aufhebung erfährt. Es entspricht durchaus dieser Annahme, daß es Sachs[1]) gelungen ist, durch einfache Säurebehandlung aktives Serum so zu verändern, daß es bei der Ausflockungsreaktion typisch positiv reagiert. Die Salzsäureeinwirkung bedeutet also augenscheinlich dieselbe Veränderung, wie wir sie durch das Inaktivieren bei 55° erreichen, nämlich eine Stabilisierung der Globuline und eine Beseitigung und Aufhebung ihrer Funktion als Schutzkolloid.

Wie schon erwähnt, kamen bei den mitgeteilten Versuchen in mehrfacher Hinsicht innerhalb gewisser Grenzen Variationen vor. Das kann nicht überraschen, da man doch annehmen muß, daß die Versuchsergebnisse mehr oder weniger von dem jeweiligen Alter und der Individualität der einzelnen Sera abhängen. So erwiesen sich zuweilen die Kohlensäureglobuline auch aus inaktiven Seris negativ; zuweilen übten auch die Salzsäureglobuline eine Ueberschußhemmung aus, und schließlich war die Ueberschußhemmung durch die Globulinfraktion gelegentlich auch nach der Inaktivierung oder bei der Gewinnung der Globuline aus inaktiven Seris vorhanden.

1) H. Sachs, Arch. f. Dermat. u. Syphilis (Herxheimer-Festschrift), 1921.

Man wird zur Erklärung annehmen dürfen, daß manchmal die Globuline eben eine so ausgesprochene Labilität besitzen, daß auch der durch das Inaktivieren bedingte Eingriff nur zu einer quantitativen, relativen Stabilisierung führt, so daß ein Teil der den Globulinen zukommenden Schutzkolloidwirkung in manchen Fällen noch nach dem Inaktivieren verbleibt. So habe ich, wenn auch keineswegs regelmäßig, beobachten können, daß manchmal auch die nativen inaktiven Sera bei Verwendung großer Dosen und gleichzeitiger Verringerung der Extraktmengen noch eine hemmende Wirkung ausüben, so daß zuweilen das Optimum für die Sachs-Georgi-Reaktion erst bei geringeren Serummengen liegt. Es entspricht dieser Umstand wohl auch früheren Angaben von Münster[1]), Plaut[2]), Meinicke[3]) und Wodtke[4]), und er kann vielleicht zur Erklärung gelegentlicher Versager bei der Sachs-Georgi-Reaktion unter der üblichen Anordnung dienen.

Jedenfalls hat sich aber in der Mehrzahl der Fälle bei geeigneter Versuchsanordnung nachweisen lassen, daß die durch Kohlensäure- und Salzsäurefällung erhaltenen Globulinfraktionen eine ausflockende Wirkung besitzen. Dabei war im allgemeinen bei der Kohlensäurefällung die Albuminfraktion fast regelmäßig stärker wirksam als die Globulinfraktion, während bei der Salzsäurefällungsmethode das relative Verhältnis der Wirksamkeit weitgehende Variationen aufwies. Abgesehen von der bei der Salzsäurefällung bewirkten Stabilisierung der Hemmungsstoffe dürfte dieser Unterschied wohl durch die geringere Stärke des Eingriffes, den die Kohlensäurefällung gegenüber der Salzsäurefällung bedeutet, bedingt werden.

Unter Berücksichtigung der hier erörterten allgemeinen Verhältnisse dürfte aber auch ein wesentlicher Unterschied im Verhalten der Sachs-Georgi-Reaktion und der Wassermannschen Reaktion in bezug auf die durch Salzsäure- und Kohlensäurefällung trennbaren Komponenten kaum vorhanden sein. Wenigstens habe ich bei vergleichenden Untersuchungen auch in der Versuchsanordnung der Wassermannschen Re-

1) M. Münster, Münch. med. Wochenschr., 1919, No. 19.
2) F. Plaut, Zeitschr. f. d. gesamte Neurologie, Bd. 52, 1919, p. 204.
3) E. Meinicke, Münch. med. Wochenschr., 1920, No. 1.
4) G. Wodtke, Münch. med. Wochenschr., 1920, No. 15.

aktion eine ähnliche Variabilität der Ergebnisse eintreten sehen, wie bei der Sachs-Georgi-Reaktion.

So zeigt z. B. das folgende Versuchsbeispiel, wie sich auch bei der Wassermannschen Reaktion die durch Salzsäure- und Kohlensäurefällung gewonnenen Komponenten verschieden verhalten können.

2 positive und 1 negatives inaktiviertes Serum wurden

I. mit Salzsäure.

II. mit Kohlensäure

gefällt.

Sodann wurden die derart erhaltenen

a) Salzsäureglobuline,

b) Salzsäurealbumine,

c) Kohlensäureglobuline.

d) Kohlensäurealbumine

zur Wassermannschen Reaktion unter Verwendung eines cholesterinierten Rinderherzextraktes benutzt.

In den Kontrollen wurde die antikomplementäre Wirkung ohne Extraktzusatz geprüft. Das Ergebnis zeigt Tabelle XII.

Tabelle XII.

	Wassermannsche Reaktion			
	I. Salzsäuretrennung		II. Kohlensäuretrennung	
	a) Globuline	b) Albumine	c) Globuline	d) Albumine
Serum positiv	±	++	+++	+++
Kontrolle	—	—	—	—
Serum positiv	+++	—	++++	++++
Kontrolle	—	—	—	—
Serum negativ	—	—	—	—

Wie die Tabelle zeigt, reagiert bei dem einen Serum das Salzsäurealbumin stärker, bei dem anderen nur das Salzsäureglobulin, während bei der Kohlensäuretrennung eine Verteilung der reaktionsfähigen Substanzen auf beide Komponenten zu ersehen ist. Daß bei dem ersten Serum nach der Salzsäuretrennung augenscheinlich überhaupt eine nicht unerhebliche Abschwächung der Reaktionsfähigkeit eingetreten ist, dürfte in der inaktivierenden Wirkung, die die Säure auf die beim serologischen Syphilisnachweis wirksamen Stoffe ausüben kann, begründet sein. Im allgemeinen darf man aber schließen, daß ähnliche Verhältnisse vorliegen, wie bei der

Ausflockung. Denn auch dort bleibt bei der Salzsäurefällung im Albumin verhältnismäßig weniger Wirkung zurück, als bei der Kohlensäurefällung. Unterschiede mehr oder weniger starken Grades kommen vor. Uebereinstimmung dürfte nach meinen Erfahrungen aber doch darin zu erblicken sein, daß die Kohlensäurealbumine — und das entspricht ja den Angaben von Gloor und Klinger, Mandelbaum, Felke u. a. — fast regelmäßig Wassermannsche Reaktion geben, daß aber die Kohlensäureglobuline dabei durchaus nicht frei von wirksamen Substanzen sind. Auch hier bestehen also ähnliche Bedingungen wie bei der Ausflockungsmethode.

Daß sich aber die Ergebnisse der beiden Verfahren nicht vollständig decken, das liegt wohl im Wesen der Methoden begründet, und ich kann mich in dieser Hinsicht damit begnügen, auf die früheren Ausführungen von Sachs und Georgi[1]) zu verweisen. Erwähnen möchte ich nur, daß ich bei Verwendung konzentrierter Globulinlösungen aus wassermannnegativen Seris auch unspezifische Reaktionen bei der Komplementbindung habe eintreten sehen. Daß die aus aktivem Serum gewonnenen Globuline derart unspezifisch reagieren, entspricht ja den schon eingangs erwähnten älteren Erfahrungen von Landsteiner und Müller, Friedemann u. a. Ich habe auch in den aus inaktivierten Seris hergestellten Globulinlösungen gelegentlich eine unspezifische Reaktionsfähigkeit bei Verwendung großer Mengen bei der Wassermannschen Reaktion beobachten können und glaube daher, daß auch in dieser Hinsicht ein grundsätzlicher Unterschied gegenüber den von Mandelbaum angegebenen und von mir bestätigten Erfahrungen bei der Ausflockungsmethode nicht besteht.

Wenn ich die von mir erhaltenen Ergebnisse zusammenfasse, so glaube ich in den Mittelpunkt die Tatsache stellen zu müssen, daß bei schwach fällenden Eingriffen, insbesondere bei der Kohlensäurewirkung, vornehmlich diejenigen Bestandteile aus dem Serum entfernt werden, die bei der Sachs-Georgischen Ausflockungsmethode im aktiven Serum die Reaktions-

1) H. Sachs und W. Georgi, Arbeiten a. d. Inst. f. experim. Ther. in Frankfurt a. M., 1920, H. 10.

fähigkeit hemmen. Wirksame Stoffe fehlen aber deswegen in den derart erhaltenen Globulinen nicht. Sie sind, wie ich zeigen konnte, in der Regel nur durch die antagonistischen Faktoren verdeckt. Man wird daher daraus schließen müssen, daß die labilsten Serumbestandteile eine Hemmungsfunktion bei der Ausflockung im Sinne einer Schutzkolloidwirkung ausüben, und daß nach Entfernen dieser Komponenten in Uebereinstimmung mit den Angaben von Gloor und Klinger, Mandelbaum und Felke eine erhebliche Reaktionsfähigkeit der Restflüssigkeit zurückbleibt. Von Bedeutung dürfte aber die Tatsache sein, daß schon bei den leicht fällenden Einflüssen, wie sie die Kohlensäure- und auch die Salzsäuremethode darstellen, bei der Ausflockung wirksame Bestandteile in den Globulinniederschlag übergehen, und daß daher auch die Euglobulinfraktion nicht der ausflockenden Wirkung entbehrt. Berücksichtigt man dabei den Umstand, daß durch die Verfahren der Kohlensäure- und Salzsäureeinwirkung nur die labileren Euglobuline betroffen werden, und daß nach den neueren Untersuchungen von Kapsenberg, die den älteren Untersuchungen von Friedemann entsprechen, beim Aussalzen der Gesamtglobuline die bei der Wassermannschen Reaktion wirksamen Stoffe annähernd quantitativ in die Globulinfraktionen gehen, so dürfte kein Grund vorhanden sein, die beim serologischen Syphilisnachweis wirksamen Stoffe nur in der Albuminfraktion des Serums zu suchen.

Man wird aber vielleicht annehmen können, daß die Serumveränderung, die unter dem Einfluß der syphilitischen Infektion entsteht, das Gesamteiweiß betrifft, daß jedoch zu ihrem Nachweis ein gewisser Grad der Labilität erforderlich ist. Die labilsten Globulinkomponenten wirken, wie sich aus meinen Untersuchungen ergibt, bei der Sachs-Georgi-Reaktion hemmend, bei der Wassermannschen Reaktion sind sie augenscheinlich entsprechend den Angaben von Gloor und Klinger die Träger der unspezifischen Reaktionsfähigkeit. Ob man nun annimmt, daß die für Syphilis charakteristischen Serumeigenschaften an die Globuline gebunden sind, wird lediglich davon abhängen, wie man den Globulinbegriff begrenzt. Versteht man darunter nicht nur die am leichtesten

fällbare Eiweißfraktion des Serums, die sogenannten Euglobuline, sondern auch die mit zunehmender Stärke des Fällungsmittels fällbaren „Pseudoglobuline", so wird nichts entgegenstehen, auch bei der Ausfällungsmethode nach Sachs-Georgi in der Globulinfraktion den wesentlichen Träger der Wirkung zu suchen.

Zusammenfassung.

1) Bei Spaltung des syphilitischen Blutserums mit verdünnter Salzsäure sind die bei der Ausflockungsmethode nach Sachs-Georgi wirksamen Stoffe sowohl in den Albuminen als auch in den Globulinen vorhanden.

2) Bei entsprechender Spaltung des syphilitischen Serums mittels des Kohlensäureverfahrens sind die wirksamen Stoffe in größerer Menge in der Albuminfraktion vorhanden.

3) Sie fehlen aber auch bei der Kohlensäuretrennung in der Globulinfraktion häufig nicht, können nur darin durch antagonistische Faktoren larviert sein.

4) Die durch Kohlensäurefällung erhaltenen Globulinfraktionen enthalten die hemmenden Stoffe, die auch im aktiven Serum die Sachs-Georgi-Reaktion verhindern. Dementsprechend wirken die durch Kohlensäurefällung erhaltenen Globuline, in geringerem Grade auch die nativen aktiven Sera hemmend auf die Ausflockung.

5) Sowohl die aus positiven als auch die aus negativen Seris durch Kohlensäurefällung erhaltenen Globuline wirken in dieser Weise antagonistisch.

6) Die antagonistische Wirkung ist thermolabil und wird durch ein halbstündiges Erhitzen auf 55° beseitigt. Sie ist als Folge einer Schutzkolloidwirkung aufzufassen, die die labilsten Komponenten der Euglobulinfraktion ausüben.

7) Auch die Globuline aus tierischen Seris können die Ausflockungsreaktion hemmen.

8) Bei der Salzsäurefällungsmethode erfolgt durch Salzsäureeinwirkung augenscheinlich eine Stabilisierung dieser labilen Bestandteile, so daß die durch Salzsäurefällung erhaltenen Globuline regelmäßiger bei der Sachs-Georgi-Reaktion reagieren.

9) In größeren Mengen wirken die Globuline unspezifisch.

10) Wassermannsche Reaktion und Sachs-Georgi-Reaktion dürften auf den gleichen Eigenschaften des syphilitischen Serums beruhen. Abweichungen im Verhalten sind wohl durch sekundäre Faktoren bedingt.

11) Wofern man unter den Globulinbegriff nicht nur die leicht fällbaren „Euglobuline", sondern auch die „Pseudoglobuline" einbezieht, steht nichts im Wege, in der Globulinfraktion den wesentlichen Träger der bei der Ausflockungsreaktion wirksamen Stoffe zu erblicken.

12) Der labilste Anteil der Globuline wirkt bei der Ausflockung meist antagonistisch und kann bei der Wassermannschen Reaktion zu unspezifischen Reaktionen Anlaß geben.

[Aus dem Allgemeinen Krankenhaus Hamburg-Barmbeck (Direktor: Prof. Dr. Th. Rumpel). Bakteriol.-serolog. Abteilung (Leiter: Privatdozent Dr. Graetz).]

Theoretische und praktische Ergebnisse mit den Flockungsreaktionen nach Meinicke.

Von Dr. med. **Walther Jantzen,**
Assistenzarzt.

(Eingegangen bei der Redaktion am 2. Juni 1921.)

Von den verschiedenen Flockungsreaktionen zur Erkennung der Syphilis haben sich nur die Sachs-Georgische Reaktion und die Meinickeschen Reaktionen dank einer ausreichenden klinischen Spezifität behaupten können. Sie beruhen beide auf einem ähnlichen Prinzip wie die WaR., nur die Sichtbarmachung des Eintretens der Reaktion ist von der WaR. verschieden. Ueber die Sachs-Georgische Reaktion ist eine sehr umfangreiche Literatur entstanden; im allgemeinen ist die Aufnahme recht günstig gewesen, völlig ablehnende Urteile finden sich kaum. Die Uebereinstimmung mit der WaR. beläuft sich etwa auf 80—85 Proz., die übrig bleibenden 15—20 Proz. differieren teils zugunsten der WaR., teils zugunsten der

S.-G.R. Ueber die Meinickeschen Reaktionen ist die Literatur bedeutend spärlicher. Das hat zum größten Teil seinen Grund wohl in der schwierigeren Technik der ursprünglichen Reaktion, der M.R. Erst die dritte Modifikation (D.M.) kommt in ihrer technischen Einfachheit der S.-G.R. gleich, resp. übertrifft sie noch. Ueber die Erfahrungen mit der M.R. liegen Berichte von Herzfeld und Klinger, Kaufmann, Kafka, Konitzer, Joel, Felke, Hayos und Molmar, Papamarku u. a. vor. Die Ansichten über den Wert dieser Methode lauten verschieden; im allgemeinen findet die Methode eine günstige Aufnahme, jedoch werden von verschiedenen Untersuchern auch erhebliche Fehlresultate konstatiert. Nachuntersuchungen der D.M. sind vor allen Dingen von Strempel, Papamarku, Konitzer, Pesch, neuerdings auch von Gaehtgens ausgeführt; die Methode wird der M.R. im allgemeinen vorgezogen. Papamarku steht der M.R. und D.M. ablehnend gegenüber.

Ich habe im laufenden Winter die für die WaR. einlaufenden Blutproben unseres Krankenhauses nach Meinicke untersucht. Mir lag vor allen Dingen daran, zu erfahren, ob die Meinickeschen Untersuchungsmethoden geeignet sind, die Differenzen, welche in manchen Fällen zwischen WaR. und klinischem Bilde bestehen, zu beseitigen. So einwandfrei die WaR. bei sorgfältiger technischer Ausführung auch ist, es kommen immer wieder einmal Fälle vor, wo sie sich in Gegensatz zur Klinik stellt. So beobachteten wir in den letzten Monaten eine, wenn auch kleine, Anzahl von Fällen, die bei florider Lues einen negativen WaR. hatten. Es waren das meistens Fälle, die vor nicht allzu langer Zeit antiluetisch behandelt wurden. Ferner bedürfen besonders solche Fälle einer Ergänzungsreaktion, die an verschiedenen Versuchstagen verschiedene Reaktionen zeigen, oder Fälle, die mit verschiedenen Extrakten nur geringe Hemmung erzielten, wo also die Diagnose vermittels der WaR. zweifelhaft bleiben muß. Offenbar sind das Sera, die nur wenig Luesreagine enthalten, die deshalb schon bei dem geringsten Ueberschuß an Komplement verdeckt bleiben können. Endlich aber lag mir daran zu erfahren, ob die WaR. und die Meinickeschen Reaktionen sich durch eine antiluetische Kur gleichmäßig beeinflussen lassen. Leider

war es nicht möglich, diese Untersuchungen getrennt nach Hg und Salvarsanbehandlung vorzunehmen. An unserem Krankenhause wird augenblicklich fast nur die kombinierte Methode, und zwar in dem letzten halben bis dreiviertel Jahr nach Linser gebraucht. Die wenigen Patienten, die anamnestisch nur Salvarsan oder nur Hg bekommen hatten, waren in zu geringer Zahl, als daß daraus Schlüsse auf die Wirkung der beiden Medikamente gezogen werden konnten.

Die Wassermannsche Reaktion wird in unserem Institut nach einer aus der Original-WaR. und der Kältemethode nach Jacobsthal im Sinne der Ausführungen von Thomsen und Boas kombinierten Methode (vgl. die Dissertation von Schwab, Zeitschr. für Immunitätsforschung, Bd. 31) ausgeführt. Als Extrakt kommt je ein alkoholischer Lues-Leberextrakt und ein cholesterinierter Rinderherzmuskelextrakt zur Anwendung. Der Komplementtiter wird am Versuchstage gegenüber den Extrakten ausgewertet. Ebenso wird an jedem Versuchstage das hämolytische System neugeprüft. Eine etwaige Eigenhemmung des Serums wird in einem Vorversuch mit einer Komplementdosis festgestellt, die der sogenannten Komplementeinheit oder einem kleinen Multiplum derselben entspricht. Unspezifische Resultate sahen wir bei unseren Untersuchungen nach der positiven Seite hin niemals, wohl aber müssen wir, wie oben schon auseinandergesetzt, einige Male Resultate nach der negativen Seite hin registrieren, die sich im Widerspruch mit der Klinik befinden.

Die Meinickeschen Reaktionen wurden mit einem alkoholischen Pferdeherzmuskelätherrestextrakt angestellt. Dieser Extrakt hat einige nicht zu unterschätzende Vorzüge vor dem bei der S.-G.R. verwendeten. Er ist leicht herstellbar, bleibt konstant und ist ohne große Schwierigkeiten für die Untersuchung einstellbar. Bei der Herstellung wurde nur insofern von der Vorschrift abgewichen, als das Trocknen des Herzmuskels bei höherer Temperatur als angegeben — etwa 60 bis 65° — vorgenommen wurde.

Als Serum verwandte ich eine halbe Stunde bei 55° inaktiviertes Serum; Parallelversuche mit einviertelstündig inaktiviertem Serum brachten keine Unterschiede zutage. Die Resultate gab ich bei der D.M. erst nach zweimal 24 Stunden ab, und zwar ließ ich Extrakt und Serum 24 Stunden bei 37° einwirken, dann noch 24 Stunden bei Zimmertemperatur. Mir fiel auf — darauf weist Gaehtgens auch neuerdings hin — daß eine größere Anzahl von Seren behandelter Fälle erst nach zweimal 24 Stunden makroskopisch sichtbar flocken. Die Diagnose, unter der das Serummaterial eingeliefert wurde, und das Resultat der WaR. verglich ich erst nach Abschluß der Untersuchungen, so daß eine Beeinflussung nicht stattfinden konnte. Hüten muß man sich, besonders bei der Beobachtung nach 48 Stunden, anfangs vor der Verwechlung mit unspezifischen Flockungen, die man aber nach einigen Versuchsreihen gut unterscheiden lernt, so daß Schwierigkeiten von dieser Seite nicht zu befürchten sind. Eine Ursache

und Gesetzmäßigkeit in der Entstehung der unspezifischen Flocken konnte ich nicht finden. Die Flocken waren meist groß und plump und schwammen in einer homogenen, leicht trüben Flüssigkeit. Die spezifischen Flocken dagegen, besonders die nach 48 Stunden entstehenden, sind meist äußerst kleinflockig und gleichmäßig auf die ganze Flüssigkeit verteilt, einer feinen Suspension ähnlich. Die Flocken stark positiver Sera nach 24 Stunden waren teilweise auch sehr großflockig, jedoch waren auch hier dieselben völlig gleichmäßig in der Flüssigkeit verteilt. Die Flüssigkeit war klar und völlig durchsichtig, ein Zeichen, daß die Lipoide meist ihren Kolloidzustand mit dem einer Suspension vertauscht hatten.

Die M.R. stellte ich genau nach den Vorschriften des Autors an. Ich hütete mich vor allen Dingen vor den besonders betonten Fehlern, wie Abkühlung der primär geflockten Sera und nicht richtiges Aufschütteln der Flocken. Schon die Titration der Kochsalzlösung machte Schwierigkeiten; die negativen Flocken lösten sich nicht immer mit der Regelmäßigkeit und Leichtigkeit, wie beschrieben. Häufig bestanden zwischen der Löslichkeit der Flocken positiver Sera so erhebliche Unterschiede, daß dieselben einer annähernd gleichprozentigen Kochsalzlösung nicht gleichmäßig widerstanden. Es war da ein mehr oder weniger großer Zufall und dem Ermessen des Untersuchers überlassen, die richtige Kochsalzlösung für den Hauptversuch zu bestimmen. Schon an und für sich ist die Anordnung und Notwendigkeit der Kochsalztitration recht mißlich, sie stellt der technischen Ausführung aus naheliegenden Gründen erhebliche Hindernisse entgegen. Durch die oben beschriebenen Unregelmäßigkeiten wird die Kochsalztitration bis zu einem gewissen Grade illusorisch gemacht Auch die Kochsalztritation selbst macht zuweilen Schwierigkeiten, und so ist es erklärlich, daß der Hauptversuch nicht immer nach Wunsch verlief. Gewiß, die Mehrzahl der Untersuchungen verlief durchaus spezifisch und teilweise zeigte sich die M.R. der D.M. und der WaR. überlegen, aber es gab wiederholt, besonders bei fieberhaften Erkrankungen, sicher unspezifische Resultate, und zwar teilweise mit so ausgesprochen stark positiver Flockung, daß ich dieser Reaktion nur ein theoretisches Interesse zusprechen möchte. Ein Hinaufgehen mit dem Kochsalztiter von 1,6 bis 2 Proz. auf Lösungen bis 3 Proz., eine Verlängerung der Lösungsdauer im Brutschrank, eine nochmalige Beobachtung der Flocken 24 Stunden nach Kochsalzzusatz verhinderten das Auftreten unspezifischer Resultate nicht. Unter einem Ausbleiben der primären Flockung, wie es nach den Literaturangaben häufiger vorzukommen scheint, hatte ich nicht zu leiden. Die primäre Flockung war mit ganz verschwindenden Ausnahmen — und das waren negative Sera — stets gut vorhanden.

Aus vorstehenden Gründen habe ich daher nach wahlloser Untersuchung einiger hundert Sera von der M.R. Abstand genommen und mich der dritten Modifikation von Meinicke zugewandt.

Im folgenden habe ich in zwei Tabellen die Ergebnisse meiner Untersuchungen mit der D.M. zusammengestellt. Die Resultate der Luesfälle sind geordnet nach der in der Klinik

üblichen Einteilung, und zwar befinden sich in den ersten 3 Abteilungen die unbehandelten Fälle, wobei bemerkt sei, daß ich die vor 1—1½ Jahren behandelten Lues latens-Fälle hier mit einbezogen habe. Daneben befinden sich in derselben Tabelle die Reaktionen, wie sie a) 0—1 Monat, b) 2—6 Monate, c) über 6—12 Monate nach der Behandlung ausfielen. Der weitaus größte Teil der Patienten war mit 0,45 Neosalvarsan plus 0,02 Sublimat nach dem Verfahren von Linser 6mal behandelt, einige wenige mit Hg und Salvarsan getrennt, eine verschwindend geringe Zahl nur mit Hg oder nur mit Salvarsan behandelt.

Tabelle I.

	Unbehandelte Fälle			Behandelte Fälle			Summe
	Lues I	Lues II	L. latens	Lues I	Lues II	L. latens	
	A. Uebereinstimmende Resultate						
WaR. + D.M. +	16	168	81	a: 8 b: 0	a: 113 b: 16	a: 53 b: 25	480
WaR. θ D.M. θ	18	10	8	a: 23 b: 1	a: 57 b: 13	a: 75 b: 49 c: 25	279
Prozentzahl	82,9 %	96,2 %	89 %	91,5 %	85,4 %	85,7 %	88,4 %
	B. Divergierende Resultate						
WaR. + D.M. θ	2: 4,9 %	3: 1,6 %	1: 1 %	a: 0 b: 0	a: 6 b: 1 3 %	a: 4 b: 1 1,9 %	18
WaR. θ D.M. +	5: 12,2 %	4: 2,2 %	10: 10 %	a: 2 b: 1 8,5 %	a: 22 b: 5 11,6 %	a: 20 b: 13 12,4 %	82
	41	185	100	35	233	265	859

In Tabelle II sind die Reaktionen bei der tertiären, der Nerven-, der Metalues und der hereditären Lues nach ihren klinischen Erscheinungen getrennt aufgeführt.

Man gewinnt bei der Betrachtung des Materials den Eindruck, daß die D.M. viel schwerer durch antiluetische Kuren zu beeinflussen ist als die WaR. Die WaR. wird sehr häufig erheblich viel schneller negativ.

Tabelle II.

	Tabes	Paralyse	Lues cerebrospinalis	Luische Gefäßerkrankg.	Tertiär luische Ulcera	Lues hereditaria
Wa. + D.M. +	3	3	8	7	8	8
Wa. θ D.M. θ	5		beh. 1: v. $^1/_2$ J.		beh. 1: v. 5 Mon.	1
Wa. + D.M. θ	4, davon 2 beh.		Kur 2: vorherg.	1	1	
Wa. θ D.M. +	2		1		1	1
	14	3	12	8	11	10

Darin stimmt die D.M. mit der S.-G.R. überein. Aus der Tabelle kann man weiterhin folgern, daß bei der Hälfte aller behandelten Fälle von Lues II beide Reaktionen in einer Zeitspanne bis zu 6 Monaten negativ werden. Dieser Uebergang zur negativen Reaktion scheint mit einer gewissen Gesetzmäßigkeit vor sich zu gehen, ohne daß man jedoch dadurch irgendwelche Folgerung auf den klinischen Zustand ziehen darf. Im allgemeinen geht allerdings das Negativwerden der Serumreaktion mit dem klinischen Befunde parallel, aber, wie ich unten weiter ausführen werde, ist das nicht immer der Fall. Bei der Lues latens ist das Verschwinden der Serumreaktion nach der Behandlung scheinbar noch häufiger; jedoch sind unter dieser Gruppe auch zahlreiche Fälle einbegriffen, die beim Beginn der Behandlung schon negative Serumreaktion hatten.

Erheblich ist die Feinheit, mit der die D.M. beim Primäraffekt eine beginnende Allgemeininfektion anzeigt, wo nach dem Ausfall der Original-WaR. noch ein seronegatives Stadium angenommen wird. Sie stimmt auch darin mit der S.-G.R. nach den vorliegenden Veröffentlichungen überein. Möglicherweise erklären sich dadurch die zahlreichen Mißerfolge der Abortivkuren bei WaR.-negativen Primäraffekten. Wenn man aber annimmt, daß die D.M. vielleicht auch noch nicht die ersten Anfänge der Allgemeininfektion anzeigt, daß der Beginn derselben noch früher gelegt werden müßte (vgl. die positiven Impfresultate bei Primäraffekten mit negativem WaR.), so sollte

das Veranlassung genug sein, die Lues I auch bei negativer Anfangs- und Abgangsserumreaktion weiter mehrmals energisch zu behandeln.

Eine gewisse Konstanz der Ergebnisse der D.M. nach der positiven Seite hin bei von Versuchstag zu Versuchstag schwankenden Resultaten der WaR. konnte ich wiederholt feststellen.

Die Beobachtung der Spätflockung nach 48 Stunden kommt vor allen Dingen den Primäraffekten und den behandelten Luesfällen zugute, besonders bei den letzteren trat die Flockung erst verzögert auf. Die relativ reichliche Zahl von negativer WaR. bei vor 1—1½ Jahren behandelter Lues latens wird sich aus der für die WaR. längeren Nachwirkung der spezifischen Behandlung erklären.

Die Untersuchungen, die in Tabelle II zusammengestellt sind, ergeben eine ungefähre Ebenbürtigkeit der WaR. und D.M. Wir finden unter 58 Fällen 46mal eine Uebereinstimmung, 9mal war die WaR. positiv, die D.M. negativ, 5mal war es umgekehrt der Fall.

Weitere 119 Fälle von Gonorrhöe und Blennorrhöe, teilweise kompliziert mit Epididymitis und Arthritis gonorrhoica, ergaben niemals eine positive D.M.

Unter 65 Fällen von Ulcera mollia, teilweise mit Bubo, fand ich einmal eine unspezifische D.M. Nach den Literaturangaben sollen bei der S.-G.R. unter dieser Rubrik häufiger unspezifische Resultate vorkommen.

Bei der Untersuchung der Sera von 456 inneren Fällen wurde 3mal eine positive D.M. bei negativer WaR. festgestellt. Das eine Serum stammte von einem Kranken mit Pleuritis, das zweite von einer Pyodermie. Im dritten Falle handelte es sich um einen normalen Menschen, der zur Bluttransfusion Verwendung finden sollte. Das Vorhandensein von Luessymptomen und eine Luesanamnese konnte in keinem dieser 3 Fälle erbracht werden. Diese inneren Fälle umfassen sonst wahllos alle Erkrankungen, die im Krankenhause zur Aufnahme kamen. Besonders hervorheben möchte ich, daß ich unter einer Reihe von Seren, die von schweren Sepsisfällen und schwerer Lungentuberkulose mit monatelangen hohen Temperaturen, teilweise mit Amyloiddegeneration der Organe, stammten,

keine unspezifischen Resultate erhielt mit Ausnahme eines Falles, wo die WaR. zweifelhaft, die D.M. positiv war, und wo Klinik und Anamnese im Stiche ließen. Die WaR. war in Uebereinstimmung mit der D.M. in diesen Fällen ausschließlich negativ; auch bei Scharlach waren stets beide Reaktionen negativ.

Einer besonderen Beachtung bedürfen die Resultate der Fälle, die Erscheinungen von florider Syphilis hatten, ohne daß eine positive WaR. nachzuweisen war. Es waren das meist Fälle, die 1—9 Monate vorher eine spezifische Kur durchgemacht hatten, und die damals bereits vereinzelt eine negative oder zweifelhafte WaR. gezeigt hatten. Die Fälle, die hier in Frage kommen, liegen leider in den Anfängen ihrer Luesbehandlung nicht in der Zeit meiner Meinickeschen Untersuchungen, so daß ein völliger Vergleich mit der WaR. nicht stattfinden konnte.

Wie die beifolgende Tabelle III erkennen läßt, versagt in der größten Anzahl dieser Fälle die D.M. ebenso wie die Original-WaR., in dem Rest der Fälle überragt die D.M. die WaR. Wie sind diese Fehlresultate zu erklären? Ich glaube nicht, daß man diese Vorgänge, wie es Delbanco neuerdings tut, mit einer allgemeinen Körperschädigung durch zu starke und zu lange Behandlung erklären kann. Wie die Tabelle ausweist, ist die Behandlung meist gar nicht so intensiv gewesen. Meines Erachtens werden wir durch diese Resultate immer wieder darauf hingewiesen, daß die Serumreaktion nur ein Symptom der Lues ist, welches allerdings fast regelmäßig vorhanden ist, das aber verschwinden kann, ohne daß die klinischen Erscheinungen zu gleicher Zeit zurückgehen. Die Serumreaktionen werden mit einer gewissen Gesetzmäßigkeit infolge der Behandlung nach einer bestimmten Zeit, und zwar wenn man aus der Tabelle I verallgemeinern darf, zu etwa 50 Proz., negativ. Unabhängig von dem Verhalten der Serumreaktion verschwinden meist auch die klinischen Erscheinungen durch die Therapie. Werden aber die Spirochäten durch die Kur nur wenig geschädigt (resistente Stämme!), so machen sie bald erneut klinische Erscheinungen zu einer Zeit, wo die Serumreaktion infolge der Behandlung noch negativ ist. Zu einem ähnlichen Resultat kommt kürzlich Fünfack; derselbe

Tabelle III.

Serum-reaktion	Symptome	Vorangegang. Behandlung. Wann abgeschlossen?	Jetzige Behandlung	Serumreaktion nach Behandlung. Abschluß	Anamnestische Daten
7381 Wa. θ	Papeln, Ulcera	Vor 14 Tagen 5 Lins., 2 Merc.	6 Linser	Wa. θ, D.M. θ	—
8144 Wa. θ D.M. θ	Papeln, auch an d. Schleimhaut des Mundes	Vor 7 Monaten 3 Salvars.- und Hg-Injektion.	6 Linser	Wa. θ, D.M. θ	—
243 Wa. θ D.M. θ	Schleimpapeln	Vor 1 1/2 Jahr Quecksilber	Linser	Wa. θ, D.M. θ, dgl. n. 1. Lins.	—
318 Wa. θ D.M. θ	Papeln an Genitalien u. Tonsillen	Vor 1 Jahr 4 Hg-Injekt., 4 Salvarsan	6 Linser	Wa. θ, D.M. θ	—
375 Wa. θ D.M. θ	Erosionen chancr.	Vor 11 Monat. 5 Salvarsan, 5 Schmiertour., 2 Merc.	6 Linser	Wa. θ	Vor 8 Mon. Wa. θ
2501 Wa. θ D.M. θ	Papeln	Vor 2 Monaten 12 Hg, 10 Salvarsan	6 Linser	Wa. schw. +	Lues 1918, damals 6 Salvars., 10 Hg, Abgangs-Wa. +
2500 Wa. θ D.M. θ	Papeln	Vor 3 Monaten 6 Linser	7 Linser	Wa. θ. Nach einer Linser Wa. +++	Vor 3/4 Jahr Lues I. Aufn. Wa. +, Entl. Wa. θ. Vor 3 Mon. Wa. θ, keine E scheinungen
8071 Wa. + D.M. θ	Roseola	Vor 1/2 Jahr 6 Linser	6 Linser	Wa. +	Vor 1 Jahr Lues I. Aufn. Wa. +, Entl. Wa. θ. Vor 6 Mon. Wa. θ
28 Wa. θ D.M. +	Roseola, Papeln	Vor 4 Monaten 3 Salvars., 3 Hg	—	—	Vor 2 Jahren reichlich Papeln, alle 3 Mon. 4 Salvars., 5 Schmiertouren
177 Wa. θ D.M. +	Kleinpapul. Syphilid	Keine Kur	6 Linser	Wa. θ, D.M. θ. Erste Linser Wa. θ	Nach 1 Mon. Wa. θ
353 Wa. θ D.M. +	Papul.-squam. Syphil. Kreuzbein, Kinn, Stirn. Papeln	Vor 5 Monaten 6 Linser	8 Linser	Wa. +	Vor 2 Jahr. Lues II, Wa. +, bisher 3 Kuren, die letzte im latent. Stadium

sah in einigen Fällen unter der Behandlung mit einem neuen Hg-Präparat die anfangs stark positive WaR. negativ werden, ohne daß die Spirochäten verschwanden. Die Serumreaktionen dürfen daher nicht ausschließlich Therapie und Diagnose leiten,

sondern dürfen nur in Verbindung mit den klinischen Erscheinungen bewertet werden. Mit Ausnahme der Fälle 177 und 375 handelt es sich bei der Aufzählung um sichere Rezidive. Die klinischen Erscheinungen waren sehr ausgeprägt, meist bestanden neben einem größeren Kranz von Papeln in der Genitalgegend auch Erscheinungen an der Schleimhaut des Mundes. Bei Fall 375 läßt sich eine Neuinfektion nicht sicher ausschließen; 177 ist eine floride Lues II mit negativem WaR., ohne daß eine Behandlung vorangegangen war.

In den letzten beiden Monaten habe ich neben dem inaktiven Serum auch stets das frische Serum für die dritte Modifikation angesetzt, parallel zur WaR. Ueber Erfahrungen mit der D.M. bei frischen Seren ist bisher nur in einer Arbeit von Epstein und Paul berichtet. Mandelbaum und Neukirch haben aktive Sera bei der S.-G.R. verwandt. Der erstere sah fast nur negative Resultate, die auch nicht besser wurden, als der Komplementgehalt durch 24-stündige Bebrütung bei 37° vernichtet wurde. Nach Neukirch flockten die aktiven Sera in der S.-G.R. völlig unspezifisch. Nach Behandlung aktiver Sera mit ausgeglühter Kieselgur trat nach dem Verfasser eine spezifische Ausflockung ein, die aber mit der S.-G.R. des inaktiven Serums nicht völlig parallel lief. Für die Praxis scheint mir dieses Verfahren aber kaum verwertbar. Meine Untersuchungen mit der D.M. an aktiven Seren übertrafen die Resultate der inaktiven. Es trat eine bedeutend stärkere und schnellere Ausflockung ein, so daß die Beobachtung für die frischen Sera häufig schon nach 3 Stunden, allermeist nach 24 Stunden abgeschlossen werden konnte. Außerdem trat häufig noch da eine positive Flockung ein, wo die D.M. mit inaktivem Serum negativ war. Soweit sich bisher übersehen läßt, kommt das Plus an Flockung besonders den behandelten Fällen zugute. Unspezifische Resultate habe ich in etwa 300 Untersuchungen nicht beobachtet, obgleich ich zu diesen Untersuchungen gerade auch Sera verwandte, die erfahrungsgemäß beim Wassermann-Versuch aktiv positive Resultate gaben und inaktiv auch häufiger unspezifisch reagieren sollen. Zwischen den unspezifischen Resultaten der WaR. beim aktiven Serum und den Resultaten der D.M. beim aktiven Serum bestand kein Parallelismus. Einige Male flockte

allerdings das frische Serum nicht, sondern nur das inaktive. Es empfiehlt sich daher, neben dem frischen Serum auch das inaktive anzusetzen, ein Verfahren, das die Ausführung nur wenig kompliziert.

Eine Variation der Mengenverhältnisse von Serum und Extrakt brachte keine brauchbareren Resultate.

Wichtig ist das Verhalten des Kaninchenserums gegenüber den Flockungsreaktionen. Bei unseren Untersuchungen mit Syphiliskaninchen wurde immer der Mangel einer brauchbaren Serumreaktion schmerzlich empfunden. Die Wassermannsche Reaktion ist beim Kaninchen sowohl nach den zahlreichen Veröffentlichungen als auch nach unseren Erfahrungen nur bedingt brauchbar. Wir haben wohl bei einer Anzahl von normalen Kaninchen im inaktiven Serum eine positive Reaktion vermißt, in anderen Fällen war sie aber ausgesprochen positiv. Ob die Ursache der positiven Reaktion auf eine Coccidiose zurückzuführen ist, oder ob die Fütterung und Jahreszeit eine Rolle spielt, das konnten wir bisher nicht sicher entscheiden. So viel steht fest, daß die WaR. unter diesen Umständen für die Luesdiagnose beim Kaninchen nicht verwertbar ist.

Konitzer und Wendlandt haben eine Reihe von Tiergattungen in ihrem Verhalten gegenüber der S.-G.R. untersucht. Gleiche Versuche mit der D.M. hatten ähnliche Ergebnisse. Die verschiedenen Tiergruppen reagieren unabhängig von ihrer Verwandtschaft zueinander positiv oder negativ. Das Serum des Normalkaninchens aber reagiert stets negativ, zweifelhafte Flockungen kommen ganz selten vor.

Die mit Spirochaeta pallida geimpften Kaninchen zeigten dagegen, wenn die Infektion anging, stets eine positive D.M. Die Reaktion trat in der Regel 6 Wochen nach der Impfung mit Spirochäten resp. spirochätenhaltigem Blut in die Testikel auf, meistens zusammenfallend mit den ersten klinischen Erscheinungen. In 2 Fällen jedoch beobachtete ich den Beginn der Flockung schon 14 Tage nach der Impfung. Die stärkere Reaktion ging den klinischen Erscheinungen parallel, die stärkste Reaktion fiel mit dem Höhepunkt der Erscheinungen zusammen, allmählich wurde dann die Reaktion wieder schwächer und wurde negativ, wenn im klinischen Bilde

Zeichen oder Folgeerscheinungen von Syphilis nicht mehr zu erkennen waren. Ich lasse die Versuchsprotokolle einiger prägnanter Fälle hier folgen.

Kaninchen 34: Ende März 1920 mit Blut von Sekundärluetiker geimpft in beide Testikel. Ende April Auftreten von starken Schwellungen beider Testikel, die Probepunktion ergibt reichlich Spirochäten. Im Verlauf der Monate starke Gewichtsabnahme, Haarausfall, Paronychien. Im September Zurückgehen der Erscheinungen. 18. XII. 20 D.M. +++, 14. I. 21 D.M. θ, 8. IV. 21 D.M. θ. Das Kaninchen ist seit etwa 4 Monaten ohne jegliche Erscheinungen.

Kaninchen 40: 17. I. 21 mit Blut von Sekundärluetiker in beide Testikel geimpft. 3. II. 21 D.M. +, 1. III. 21 starke Schwellung eines Testikels; zahlreiche Spirochäten. Keine Allgemeinerscheinungen. 4. III. 21 D.M. ++, 14. III. 21 wird der erkrankte Testikel entfernt. 8. IV. 21 D.M. θ. Normaler Allgemeinzustand.

Kaninchen 65: 5. XI. 20 mit Blut von Syphilitiker geimpft. 12. I. 21 in einem Testikel zahlreiche Spirochäten. D.M. ++. Keine Allgemeinerscheinungen. 27. II. 21 Erscheinungen völlig zurückgegangen. D.M. θ, Wa. θ.

Aus diesen Angaben ist zu ersehen, daß die D.M. ein guter Indikator für die Kaninchenlues ist. Es findet ein fast völliges Parallelgehen mit den klinischen Erscheinungen statt. Beachtenswert erscheint mir dabei, daß die Reaktion von selbst wieder verschwindet. Die menschlichen Spirochätenstämme haben vor ihrer Anpassung an den Tierkörper offenbar für die Kaninchen eine sehr geringe Virulenz. Bei einer größeren Anzahl scheint die mit diesen Stämmen hervorgerufene Kaninchenlues auszuheilen, jedenfalls spricht dafür, wenn man auf die Verhältnisse beim Menschen Rückschlüsse ziehen darf, das dauernde Verschwinden der Serumreaktion und der negative klinische Befund. Neuimpfung führte zu Neuinfektion mit Wiederauftreten der Serumreaktion. Völlig kann eine Superinfektion jedoch nicht ausgeschlossen werden, da am Gehirn von Tieren, die monatelang keine klinischen Erscheinungen gezeigt hatten, noch frischere Veränderungen gefunden worden sind (Weygandt und Jakob).

Zahlreiche Versuche sind ausgeführt worden, um durch Trennung der verschiedenen Serumbestandteile auf die Natur und Struktur der Luesreagine zu schließen. Sie haben zu keinem eindeutigen Resultat geführt.

Friedemann trennte bekanntlich die Serumstoffe durch Aussalzen mit Ammoniumsulfat in eine Globulin- und Albuminfraktion und stellte mit diesen Komponenten die WaR. an. Er kam dabei zu dem Resultat, daß die Globuline vieler frischer normaler Menschensera die WaR. geben. Die Globuline luetischer Sera sind WaR. +. Mit dem Albumin luetischer Sera erhielt er keine WaR. Friedemann schließt daraus, daß die durch Lues hervorgerufenen Veränderungen an die Globuline geknüpft sind.

Gloor und Klinger kommen dagegen zu anderen Resultaten. Sie fällten die Globuline mit $n/_{300}$ HCl aus und fanden die WaR. in der übrigbleibenden Albuminfraktion ebenso stark wie vorher. Nur die künstliche Luesreaktion, wie sie manchmal durch Behandlung mit Kaolin, Bakteriensuspensionen etc. entsteht, ist an die Globulinfraktion gebunden. Nathan stellte fest, daß die S.-G.R. in diesen Fällen völlig negativ blieb.

Mandelbaum fällte die Globuline mit Aqua dest., das mit CO_2 angesäuert war; er löste dieselben in physiologischer Kochsalzlösung wieder auf und stellte mit dieser Auflösung die S.-G.R. an, sie verlief völlig uncharakteristisch.

Bevor man sich mit diesen Fällungsmethoden zur Differenzierung der verschiedenen Eiweißarten im Serum befaßt, muß man sich völlig im klaren darüber sein, daß die verschiedenen Eiweißfraktionen, die bei der Fällung nach einer Methode entstehen, durchaus nicht untereinander völlig gleichartig sind, und daß diese Unterschiedlichkeit natürlich in noch viel größerem Maßstabe bei den Fraktionen besteht, die bei Verwendung verschiedener Fällungsmittel entstehen. Der Begriff Globulin, Albumin ist in der Chemie kein völlig fest umschriebener, eine reinliche Trennung ist praktisch nicht möglich. Aus diesen Verhältnisssen erklären sich mit großer Wahrscheinlichkeit die Differenzen bei den Untersuchungen obengenannter Autoren.

Die dritte Modifikation gibt, verglichen mit den über die S.-G.R. veröffentlichen Resultaten, mit den verschiedenen Serumfraktionen teilweise andere Resultate.

Ich habe eine Anzahl Sera nach der Methode von Sachs und Altmann mit $n/_{250}$ HCl, resp. mit der 4-fachen Menge gesättigter Kohlensäurelösung gefällt, die Globuline gelöst und vermittels der D.M. und WaR. untersucht. Unspezifische Resultate nach der positiven Seite hin habe ich in diesen Globulinlösungen niemals erhalten, wohl aber reagierten einige Globulinlösungen positiver Sera negativ. Differenzen zwischen WaR. und D.M. kamen bei diesen Untersuchungen vielfach

vor, in geringer Anzahl zugunsten der D.M. Bemerkenswert war das Verhalten der Globulinlösung eines Serums von einer kürzlich behandelten Lues latens. Während D.M. und WaR. im Originalserum negativ blieben, flockte die Globulinlösung in der D.M. stark aus. Aehnliche Beobachtungen machte ich bei der kurzfristigen Behandlung inaktiver positiver Sera mit Bariumsulfat. Es trat wiederholt eine bedeutend klarere und kräftigere Flockung auf. Als Erklärung kann wohl die Entfernung von Eiweißspaltprodukten, die sich den Flocken in unbehandeltem Serum anlagern und dieselben zu homogenisieren versuchen, angenommen werden.

Das unregelmäßige Uebergehen der WaR. und D.M. auf die gelöste Globulinkomponente des inaktiven Serums spricht gegen die Annahme von Herzfeld und Klinger, daß alle Luesreaktionen inkl. WaR. auf dem Nachweis stark labiler Globuline beruhen. Stark labile Globuline werden sicherlich durch diese Fällungsmethoden gefällt und befinden sich demnach in der gelösten Globulinkomponente. Trotzdem finden wir hier nicht regelmäßig, weder nach Zahl noch Stärke, eine positive D.M. resp. WaR., wo wir sie nach dem Ausfall im Originalserum erwarten müßten. Auch die Meinickesche Theorie, die auf einer Zustandsänderung der Globuline durch die Einwirkung des Extraktes basiert, findet durch diese Versuche keine Stütze, da eine regelmäßige Einwirkung auf die Globulinkomponente nicht stattfindet. Gegen eine fest umschriebene kolloid-chemische Struktur des Luesserums als Voraussetzung für die Flockung der D.M. sprechen die Ergebnisse der D.M. mit den Globulinlösungen frischer Sera. Fällte ich frische Sera mit $n/_{250}$ HCl und löste ich die dabei entstehenden Flocken nach Waschen mit Aqua dest. wieder auf, so bleibt ein großer Teil der Flocken ungelöst und muß vor weiteren Versuchen abzentrifugiert werden. Trotzdem gibt der gelöste Teil von positiven Seren noch eine spezifische Reaktion. Die Flockung ist allerdings durchweg bedeutend geringer als im Originalserum, aber das ist ohne weiteres erklärlich. Wir müssen annehmen, daß die Globuline bei ihrer Fällung die Luesreagine nur mitreißen. Wieviel und ob sie überhaupt spezifische Stoffe mitreißen, das hängt von der zufälligen kolloiden Beschaffenheit der Globuline, von der Reaktion

des Serums, von der Temperatur und anderen äußeren Ursachen ab. Ist dadurch schon für die Fällung im inaktiven Serum die Reaktion der Globulinlösung durchaus nicht gewährleistet, so ist das in vermehrtem Maße von der Globulinlösung der aktiven Sera zu sagen, da hier ja wieder nur ein Teil der Fällung gelöst ist.

Die Behandlung von Seren mit kristallinischen Stoffen, wie Bariumsulfat, Bariumkarbonat etc., bewirkt ebenfalls eine Entziehung der Globulinfraktion, jedenfalls reagierten Sera, die mit dichter Bariumsulfataufschwemmung 2mal 24 Stunden bei 37° behandelt wurden, mit $n/_{250}$ HCl nur mit geringer oder gar keiner Trübung, ebenso bewirkte ein Zusatz von gesättigter Ammoniumsulfatlösung zu gleichen Teilen zum Serum einen gegen die Norm wesentlich verminderten Niederschlag. Die WaR. und die D.M. des abzentrifugierten Serums gaben unabhängig davon bald negative, bald positive Resultate, jedoch ohne Unspezifität nach der positiven Seite hin. Noguchi und Bronfenbrenner haben in einer Arbeit, die mir leider im Original nicht zur Verfügung stand, auf diese Art der Adsorptionsmöglichkeit der Luesreagine zuerst hingewiesen. Wir haben uns den Vorgang so vorzustellen, daß die Globuline adsorbiert werden; diese reißen die Luesreagine mit derselben Unregelmäßigkeit mit sich, mit welcher es die durch $n/_{250}$ HCl bewirkte Globulinfällung tut. Ist das Globulin adsorbiert, was meist nach 2mal 24 Stunden bis auf geringe Grade erfolgt ist, ohne die Luesreagine mitzureißen, so ist WaR. und D.M. im abzentrifugierten Serum positiv. Die Globuline sind demnach für Flockung und WaR. nicht unbedingt notwendig.

Um eine spezifische Adsorption der Luesreagine aus dem Serum zu erreichen, habe ich dieselbe an die Bestandteile des Meinicke-Extraktes zu binden versucht. Bei dieser Versuchsanordnung mußte es gelingen, die Luesreagine, die durch die D.M. zur Darstellung kommen, vollständig zu entfernen. Ich ging dabei so vor, daß ich die Lipoide des Meinicke-Extraktes durch Zusatz von Kochsalzlösung fällte und dieselben durch Zentrifugieren von dem Alkohol befreite. Diese Flocken nahm ich dann zu einer dichten Emulsion mit physiologischer Kochsalzlösung auf und absorbierte diese Emulsion mit Bariumsulfat. Das aus Lipoiden und Bariumsulfat bestehende Zentri-

fugat habe ich dann positiven Seren zugefügt, und zwar etwa im Mengenverhältnis 1 : 3. Nach 24-stündiger Behandlung bei 37° mit dieser Mischung gelang es mir häufig, nach 2mal 24 Stunden fast stets, die D.M. negativ zu machen, während die WaR. schon nach 24 Stunden, manchmal schon nach 2 Stunden negativ war.

Diese Versuche sind in Parallele zur Absorption mit fein zerriebenen Organaufschwemmungen zu stellen. Hier findet die spezifische Absorption wahrscheinlich durch die Organlipoide statt. Die Versuche, die ich mit zerriebener Meerschweinchenleber und positiven Seren in dieser Hinsicht anstellte, bestätigen die Ergebnisse anderer Untersucher. Positive Sera wurden nach 1—1½-stündiger Behandlung mit Meerschweinchenleberaufschwemmung (0,8—1,0 g auf 0,5 ccm Serum) stets WaR. 0, der Einfluß auf die D.M. war fast ein gleicher. Die Versuche B r e i n l s, die mit abgestuften Mengen von Meerschweinchenleberaufschwemmung eine Trennung „zwischen spezifischer Luesreagin- und unspezifischer Globulinabsorption“ erreichten, gelangen mir nicht völlig eindeutig (Tabelle IV). In meinen Versuchen hatten auch die Röhrchen mit den kleinen Organmengen eine verminderte Globulinfällung.

Tabelle IV.

Komplement	0,5 ccm Luesserum, behandelt mit Meerschw.-Leberemulsion								Aufgelöste Globulinflocken von mit Meerschw.-Organ behandelt. Serum							
	0		0,5		0,3		0,1		0		0,5		0,3		0,1	
	WaR.	D.M.	WaR.	D.M.	WaR.	D.M.	WaR.	D.M.	WaR.	D.M.	WaR.	D.M.	WaR.	D.M.	WaR.	D.M.
0,5	+++	++	θ	+	θ	+	θ	+	++	+	θ	±	θ	±	θ	+
0,4	+++		θ		θ		+		++		θ		θ		+	
Globulinfällung:	+++		Gering. Trübg.		Gering. Trübg.		+									

Die abzentrifugierten Sera hatten stets eine negative WaR., die D.M. war überall, wenn auch herabgesetzt, positiv. Die aufgelösten Globulinflocken reagieren nach D.M. und WaR. bis auf die Sera, die nur mit geringer Organemulsion behandelt waren, negativ.

Adsorptionsversuche mit gekochten Hammelblutkörperchen und mit Pferdeherzmuskel fielen, wenn auch lange nicht mit der Regelmäßigkeit, ähnlich wie die Versuche mit Meerschweinchenleber, aus. Bei den Versuchen mit Pferdeherzmuskel trat häufig Autotropie des Serums ein; durch Vorbehandlung des Pferdeherzmuskels mit Aether und Alkohol wurde dieselbe in den meisten Fällen vermieden.

Aus den Versuchen, wie aus den Ergebnissen des klinischen Materials geht hervor, daß die WaR. und die D.M. in der Empfindlichkeit, Luesreagine anzuzeigen, verschiedentlich differieren. Die Gründe für diese Differenz sind mannigfaltig.

Einer der Hauptgründe hierfür ist sicherlich die Dauer der Versuchszeit; es ist anzunehmen, daß bei einer geringen Anzahl von Reaginen — bei den Differenzen handelt es sich meist um Fälle, bei denen wenig Reagine anzunehmen sind — die Zeitdauer, welche für die Vereinigung von Antikörpern und Antigen zur Verfügung steht, nicht gleichgültig ist. Die Avidität der Luesreagine zu den Extrakten ist bei Vorhandensein nur geringer Mengen herabgesetzt. Der Mangel der Avidität wird teilweise durch die längere Dauer der Versuchszeit bei den Flockungsreaktionen kompensiert. Daß die Zeitdauer einen großen Einfluß hat, das sieht man aus der spät einsetzenden Flockung der D.M. Handelt es sich hier um Zeitdifferenzen von 24 Stunden, wieviel mehr muß dagegen in solchen Fällen die Versuchsdauer von einer Stunde abstechen. Die Versuchsergebnisse würden sicher noch erheblicher zu Ungunsten der WaR. differieren, wenn nicht die kürzere Reaktionszeit eine Kompensation durch die größere Empfindlichkeit der Komplementbindung erführe, und wenn nicht geringe Reaktionen dem Auge durch das hämolytische System schon gut sichtbar würden. Aehnliche Verhältnisse sind uns übrigens in der Immunitätswissenschaft durchaus geläufig. Seitdem die WaR. durch die Einführung alkoholischer Organextrakte durch Levaditi und Landsteiner des spezifischen Charakters als Immunitätsreaktion im üblichen Sinne entkleidet wurde, gilt fast allgemein die Auffassung, daß es sich bei der WaR. um eine Reaktion zwischen Lipoiden resp. Lipoideiweißverbindungen des Serums und des Extraktes

handelt, eine Auffassung, welche ja auch in den neuesten Ausführungen von Wassermann ihren verstärkten Ausdruck findet. Eine gleiche Auffassung ist für die Ausflockung möglich, zumal durch die Untersuchungen von Epstein, Mandelbaum und Niederhoff die Lipoidnatur der bei den Ausflockungsreaktionen entstehenden Flocken festgestellt ist. Wir können also die Ausflockung den Präzipitationsvorgängen bei Eiweiß-Antieiweißreaktionen parallel setzen. Bei letzteren besteht nun durchaus kein Parallelismus zwischen Präzipitation und Komplementbindung; im Gegenteil, wir finden den Gegensatz häufig viel stärker ausgeprägt als bei den Luesreaktionen; Sera mit sehr hohem Präzipitationstiter haben häufig überhaupt kein Komplementbindungsvermögen und umgekehrt. Worauf diese Differenzen im Verhalten verschiedener Sera beruhen, das ist bisher nicht geklärt. Vielleicht geht man nicht fehl, wenn man nach Sachs annimmt, daß für die Komplementbindung eine bestimmte, vielleicht ultramikroskopische Flockung nötig ist; tritt dieselbe nicht ein, so bleibt das Komplement frei. Nicht ausgeschlossen aber ist es, daß Präzipitation und Komplementbindung durch zwei verschiedene Körper hervorgerufen werden. Das Luesreagin als einen Komplex von Antikörpern aufzufassen, dagegen bestehen wenigstens nach unserer heutigen Auffassung von seiner Entstehung keine theoretischen Bedenken.

Müssen wir bei den Flockungsreaktionen zum Nachweis der Lues auch eine ausschließlich kolloid-chemische Betrachtung ablehnen, so ist nichtsdestoweniger eine gewisser kolloider Zustand zum Ausfall der Flocken notwendig. Ist das Kolloidgemisch des Serums nicht dicht genug, so werden die Flocken nicht ausfallen, sondern in Lösung bleiben. Dadurch wird der Lipoid-Antilipoidbindungsvorgang dem Auge nicht sichtbar werden. Zu dieser Erkenntnis kommt man auch durch folgenden Versuch: Sprengt man die an Meerschweinchenleber adsorbierten Luesreagine bei 46° in physiologischer Kochsalzlösung ab, so ergibt diese Flüssigkeit eine positive WaR., eine negative D.M. Setzt man zu dieser Flüssigkeit eine der Flüssigkeitsmenge entsprechende Globulinfällung eines beliebigen Normalserums hinzu, so reagiert diese Lösung auch vermittels der D.M.

positiv. Die „Eiweißkonzentration" war also vor dem Globulinzusatz für das Entstehen und Bestehen der Flocken nicht groß genug.

Neben dem Auftreten von spezifischen Antikörpern besteht auch eine Veränderung der Eiweißstoffe im Luesserum. Das beweisen die Fällungsversuche nach Bruck, Klausner u. a. Diese Veränderungen finden wir aber bei Allgemeinerkrankung häufiger, dieselbe stellt keine für das Luesserum absolut spezifische Tatsache dar. In gleicher Weise ist für den Extrakt ein bestimmter Kolloidzustand erforderlich. Die Kolloide in ihm müssen sich sozusagen in einer gewissen Latenz befinden, so daß sie auf geringe Zustandsänderungen, wie sie die Vereinigungen des Lipoids mit dem Antilipoid darstellen, mit Ausflockung reagieren. Sind die Kolloide auf Zustandsänderungen zu empfindlich, so kommt es zu unspezifischen Flockungen; sind sie nicht empfindlich genug, so tritt keine Flockung ein, und es werden je nach Empfindlichkeit des Extraktes mehr oder weniger Lipoid-Antilipoidkörperbindungen nicht registriert werden können. Aehnliche Verhältnisse können wir für die WaR. annehmen. Durch unrichtig eingestellte Extrakte kommt es ohne spezifische Vorgänge schon zur ultramikroskopischen Flockung und dadurch zu einer unspezifischen Adsorption des Komplements.

Die primären Flocken bei der M.R. sind nicht einheitlich. In der Reihe der positiven Sera werden sie aus Lipoiden und Globulinen bestehen, bei den negativen nur aus Globulinen. Für die Lösung der Globuline ist eine bestimmte untere Grenze der Salzkonzentration nötig; diese Grenze wird durch den Zusatz von der 4-fachen Menge des bei der M.R. Verwendung findenden völlig salzfreien Extraktes nach unten zu überschritten. Wird später wieder Kochsalz zugesetzt, so verschwindet die Globulinflockung, und es bleibt bei den positiven Seren die reine Lipoidflockung übrig.

Erhebliche Schwierigkeiten bereitet die Erklärung der auf Immunitätsvorgänge übertragenen Flockungsreaktion, vor allen Dingen also der Lipoidbindungsreaktion zur Rotzdiagnose von Meinicke und der Nachweis von Diphtherieantitoxin von Georgi. Bis jetzt kann man dem Extrakt hier nur die

Rolle eines Indikators für die Vereinigung des Toxins mit dem Antitoxin, des Antigens mit dem Antikörper zuerteilen. In diesem Sinne sind sie jedenfalls aufgebaut. Ob nebenher gewisse Antilipoide — solche entstehen anscheinend bei jedem Immunitätsvorgang — eine Rolle spielen, muß die weitere Erfahrung mit diesen Reaktionen, die bisher für die Praxis nicht verwendbar sind, entscheiden. Man würde sich die Verhältnisse z. B. so vorstellen können, daß das Antitoxin aus einer Antieiweiß- und Antilipoidkomponente besteht, das Toxin dagegen nur das Eiweißantigen, der Lipoidextrakt nur die Lipoidkomponente enthält. Eine Vereinigung aller vier würde unter gewissen äußeren Bedingungen, die, wie oben auseinandergesetzt, von der Kolloidstruktur des Serums und des Extraktes abhängig sind, zu einer Ausflockung führen. Einer gleichen Erklärung wäre der Rotznachweis zugänglich.

Die Frage ist noch nicht geklärt, ob die alkoholischen Extrakte aus Organen einen ähnlichen art- und organspezifischen Charakter haben, wie die die Eiweißstoffe enthaltenden wäßrigeren Auszüge. Wir kennen bisher nur einige Eigenschaften, die auf den alkoholischen Extrakt übergehen. So zeigten Doerr und Pick, Sachs und Georgi die Alkohollöslichkeit der Hammelblutrezeptoren verschiedener Organe (Pferd, Meerschweinchen etc.), die durch Verimpfung beim Kaninchen die sogenannten heterogenetischen Antikörper hervorrufen können. Ebenso wies Kurt Meyer auf den spezifischen Charakter von alkoholischen und ätherischen Bandwurmauszügen hin. Auf der Tatsache der Alkohollöslichkeit bauten Sachs und Guth eine Methode zum Nachweis von heterogenetischem Hammelbluthämolysin auf. Wurden alkoholische Auszüge aus Meerschweinchenleber oder Pferdeniere mit Hammelbluthämolysin enthaltendem Blut in der Art zusammengebracht, wie es die S.-G.R. vorschreibt, so trat Flockung ein. Diese Versuche finden wir bestätigt bei der Verwendung des Meinickeschen Pferdeherzmuskelextraktes. Das Serum von mit Hammelblutkörperchen und Pferdeorganen (Corpus luteum, Niere) vorbehandelten Kaninchen flockte in der Versuchsordnung der D.M. aus; und zwar scheint die Stärke der Flockung mit der Größe der hämolytischen Fähigkeiten parallel zu gehen.

Mit den Extrakten müssen wir auch den Antikörpern, den sogenannten Antilipoiden, spezifische Eigenschaften zuerkennen. Außer den eben erwähnten heterogenetischen Antikörpern, die nur mit alkoholischen Auszügen aus den Organen, welche sie hervorrufen, Flockungen geben, müssen wir mit Meyer spezifische Antilipoide gegen Bandwurmlipoide anerkennen. Auch die Hämolysine bei der paroxysmalen Hämoglobinurie — ihre Antilipoidnatur ist allerdings noch nicht einwandfrei festgestellt — haben besondere Eigenschaften, die sie z. B. von Luesreaginen unterscheiden lassen. Sie binden sich z. B. gern mit nativen roten Blutkörperchen, während die Luesreagine sich gegen dieselben höchst refraktär verhalten. Beiden gemeinsam ist die Affinität zum Wassermannextrakt. Vielleicht ist auch die Bevorzugung bestimmter Organe für die Wassermann- und Meinicke-Extrakte der Ausdruck einer Organspezifität und hängt nicht ganz von äußeren Umständen ab. Vielleicht sind die Luesreagine eine Art heterogenetischer Antikörper, die in gewissem festen Verhältnis zu bestimmten Organlipoiden stehen, ähnlich wie die Hammelbluthämolysine.

Zusammenfassung.

1) Die D.M. eignet sich vorzüglich zur Ergänzung der Wassermannschen Reaktion, sie ergibt da häufig noch gute Resultate, wo die WaR. versagt. Jedoch muß die Beobachtungsdauer 48 Stunden betragen. Neben dem inaktiven Serum empfiehlt sich dringend die Verwendung frischer Sera. Die Versuchszeit wird dadurch abgekürzt, die Empfindlichkeit bedeutend gesteigert, ohne daß unspezifische Resultate auftreten.

2) Die M.R. gibt häufiger unspezifische Resultate; sie ist deswegen und wegen ihrer schwierigen Technik als Ergänzungsreaktion ungeeignet.

3) Die D.M. eignet sich gut zur Luesdiagnose beim Kaninchen.

4) Der Flockungsvorgang beruht wahrscheinlich auf demselben Prinzip wie die WaR. Jedoch spielen kolloidchemische Zustände bei der Flockungsreaktion eine größere Rolle.

5) Die alkoholischen Extrakte aus den Organen behalten einen Teil ihres organ- und artspezifischen Charakters.

Literatur.

1) Meinicke, Die Lipoidbindungsreaktion. Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 29 (dort die anderen Arbeiten von Meinicke zitiert).
2) Breinl, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 29.
3) Nathan, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 29.
4) Wendlandt, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 30.
5) Neukirch, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 29; Med. Klin., 1920, No. 3.
6) Gloor und Klinger, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 29.
7) Joel, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 29.
8) Meyerink, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 30.
9) Baumgärtel, Berl. klin. Wochenschr., 1921, No. 10.
10) Wassermann, Berl. klin. Wochenschr., 1921, No. 9.
11) Friedemann, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 67, 1910.
12) Sachs und Guth, Med. Klin., 1920, Heft 6.
13) Papamarku, Med. Klin., 1920, Heft 36.
14) Strempel, Med. Klin., 1921, Heft 3.
15) Delbanco, Med. Klin., 1921, Heft 16.
16) Hayos und Molnar, Wiener klin. Wochenschr., 1920, p. 966.
17) Mandelbaum, Münch. med. Wochenschr., 1920, No. 33.
18) Epstein, Münch. med. Wochenschr., 1921, p. 491.
19) Niederhoff, Münch. med. Wochenschr., 1921, No. 11.
20) Pesch, Münch. med. Wochenschr., 1920, No. 3.
21) Gaehtgens, Arch. f. Dermatol. u. Syph., Bd. 129, 1921.
22) Noguchi and Bronfenbrenner, Journ. of exp. Med., Vol. 13, 1911.
23) Fünffack, Deutsche med. Wochenschr., 1921, No. 12.
24) Konitzer, Med. Klin., 1919, No. 14.
25) — Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 30.
26) Epstein und Paul, Arch. f. Hyg., Bd. 90, Heft 3.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Leipzig
(Direktor: Geheimrat Prof. Dr. W. Kruse).]

Vergleichende Untersuchungen über Antikörperbildung bei Gonorrhoe [1]).

Von Dr. med. **Hellmuth Fey,**
Volontärarzt am Institut.

(Eingegangen bei der Redaktion am 17. Juni 1921.)

Die Untersuchungen von Jötten (1) über die Beziehungen verschiedener Gonokokkenarten zur Schwere der Infektion ermittelten unter 27 zur Untersuchung gelangten Gonokokkenstämmen 20 Stämme, die sich durch Agglutination und Komplementbindung in 4 Gruppen A, B, C und D einteilen ließen. Eine nähere Untersuchung dieser Gruppen ergab, daß die Gruppen A und B in Reagenzglasversuchen mit Normalserum der Phagozytose und Bakterizidie gegenüber erheblich widerstandsfähiger sich verhielten als die Gruppen B und D und die nicht gruppierten Stämme, für Mäuse größere Toxizität zeigten und beim Menschen in der Regel zu ernsteren Erkrankungen mit häufigeren Komplikationen geführt hatten. Die weitere Beobachtung, daß bei der Immunisierung von Mäusen durch Injektion lebender Gonokokken bei späterer Einspritzung tödlicher Dosen sichere Resultate ohne Todesfälle nur zu erreichen waren, wenn zur Vorbehandlung und Nachimpfung ein und derselbe Stamm benutzt worden war, führte Jötten zur erneuten Empfehlung der Eigenimpfstoffbehandlung. Bei der im großen Maße durchgeführten Behandlung menschlicher Gonorrhoe mit Eigenimpfstoffen wurden nun wiederholt von Aerzten Eigenimpfstoffe für Fälle gefordert, in denen sich die Herauszüchtung einer Gonokokkenreinkultur als unmöglich erwies. Ist doch gerade die chronische Gonorrhoe die eigentliche Domäne der Impfstoffbehandlung, und es liegt auf der Hand, daß nicht in seltenen derartigen Fällen (alte Prostatitis und Epididymitisfälle, gonorrhoische Adnexerkrankungen) gonokokken-

1) Inaug.-Diss., Leipzig, Juli 1921.

haltiges Sekret nicht zu erhalten war und sich zum Teil auch durch provokatorische Maßnahmen nicht erhalten ließ. In einem weiteren Teil der Fälle ließ sich bei der schweren Züchtbarkeit der Gonokokken auch aus gonokokkenverdächtigem Material trotz aller Mühe eine Ausgangsreinkultur für die Impfstoffherstellung nicht erreichen; in vereinzelten Fällen zeigte das Ausstrichpräparat des Harnröhrensekretes sogar typische und zahlreiche Gonokokken, die aber aus unbekannten Gründen in Kultur niemals angingen. Für alle diese der Eigenimpfstoffbehandlung nicht zugänglichen Fälle würde es nun wertvoll sein, wenn sich mittels serologischer Methoden ein dem im betreffenden Krankheitsfall vorliegenden identischer oder wenigstens ähnlicher Gonokokkenstamm herausfinden ließe, der sich dann an Stelle des Eigenimpfstoffes mit Erfolg zur Behandlung benutzen ließe. Diese praktische Erfordernis lenkte somit den Blick auf die Verhältnisse der Antikörperbildung bei der menschlichen Gonorrhoe, die ja bei dieser Erkrankung im Gegensatz zu der Mehrzahl der Infektionskrankheiten auch heute noch als wenig durchsichtig zu bezeichnen sind. Als allgemein anerkannt muß allerdings die Anwesenheit spezifischer komplementbindender Substanzen im Serum chronischer Gonorrhoiker gelten, bezüglich der Agglutination aber finden sich so verschiedene Angaben, daß Bruck im Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle-Wassermann zu dem Schluß kommt, daß die Agglutination als diagnostisches Moment bei Gonorrhoe keine Bedeutung habe. Die Mehrzahl der Untersucher [Bruck (2), Jundell (3), Scholz (4), Finkelstein (5)] hatte bezüglich der Agglutination nur negative Resultate, ein anderer Teil [Watabiki (6)] nur in einer geringen Zahl der untersuchten Fälle positive Resultate. Es liegt nun vielleicht die Möglichkeit vor, daß die wenigen positiven Ergebnisse davon herrühren, daß nicht genügend verschiedenartige Stämme zu den Untersuchungen verwandt wurden und ein dem betreffenden Patientenstamm gleicher oder wenigstens ähnlicher Gonokokkentyp unter den herangezogenen Stämmen nicht enthalten war, mit anderen Worten also, daß die Verschiedenartigkeit der Gonokokkenfamilie nicht genügend berücksichtigt wurde. Daß innerhalb der Gonokokkenfamilie eine

Differenzierung der Stämme wahrscheinlich sei, sprachen schon Teague und Torrey (7) aus, da sie fanden, daß die Antikörper aus verschiedenen Stämmen mit den aus anderen Stämmen bereiteten Antigenen in vielen Fällen negativ reagierten. Torrey fand bei seinen Agglutinationsversuchen, daß die zur Untersuchung verwandten Stämme kreuzweise agglutiniert wurden, und durch die Absorptionsmethode ergab sich, daß die Gonokokkenfamilie verschiedenartig ist oder aus Gruppen besteht, die gemeinsame und spezifische Eigenschaften haben. Auch Vannod (8) fiel beim Studium von 20-tägigen Gonokokkenkulturen aus de Christmas'scher Bouillon auf, daß die Toxinbildung verschiedener Kulturen sehr ungleichmäßig war. Schwartz und Mac Neil (9) nahmen Komplementbindungsversuche vor, bestätigten die Befunde von Teague und Torrey und erhoben dementsprechend die Forderung, daß für klinische Zwecke deshalb stets aus möglichst viel verschiedenen Stämmen hergestellte Antigene zu verwenden seien. Watabiki (6) gelang es mittels bei der Komplementbindungsmethode nachzuweisender spezifischer Ambozeptoren seine untersuchten Gonokokkenstämme in zwei Gruppen zu teilen, den Unterschied beider Gruppen hält er aber nicht für wesentlich und findet insbesondere, daß keine Beziehungen zwischen Komplementbildung und Agglutination bestehen. Jötten (1) endlich gelangte zu der oben erwähnten Gruppeneinteilung in giftige oder weniger giftige Stämme.

Verfasser setzte es sich nun zum Zwecke der Impfstoffherstellung für die der Eigenimpfstoffbehandlung nicht zugängigen Fälle zur Aufgabe, das Verhalten des Gonorrhoikerserums zu möglichst verschiedenen Gonokokkenstämmen zu untersuchen, und prüfte eine Anzahl Gonorrhoikerseren hinsichtlich Agglutination, Komplementbindung und Präzipitation unter Verwendung möglichst zahlreicher Gonokokkenstämme, doch unter Vermeidung der Verwendung von Mischantigenen. Zu diesem Zweck verwandte er die zahlreichen Gonokokkenreinkulturen, die im Institut bei der Herstellung von Eigenimpfstoffen herausgezüchtet wurden. Die zur Untersuchung gelangten Seren stammten ausschließlich von Fällen chronischer Gonorrhoe, die zum Teil schon jahrelang bestand und in der reichlichen Hälfte der Fälle mit anderweitigen Erkrankungen

(Prostatitis, Epididymitis, Adnexerkrankungen) kompliziert war und allen therapeutischen Maßnahmen getrotzt hatte. Für die Zusendung der Patientenseren zur Untersuchung bezw. für Zuweisung der Patienten zur Blutentnahme sind wir den Herren Dr. Dr. Burckas und Haugk, Spezialärzten in Leipzig, und Herrn Dr. Oelze von der dermatologischen Universitätsklinik in Leipzig zu Danke verpflichtet.

Agglutination.

Die in der Literatur niedergelegten Ergebnisse von Agglutinationsversuchen lauten so verschieden, daß, wie erwähnt, Bruck der Agglutination bei Gonorrhoe jede diagnostische Bedeutung abspricht. Das Auftreten von Agglutininen wurde zuerst von Wildbolz und Bärmann (10) in einem Falle von Epididymitis beobachtet; Bruck, Jundell und Scholz hatten nur negative Resultate. Bruck (2) z. B. prüfte 6 Fälle gonorrhoischer Adnexerkrankungen, bei denen sich spezifische Immunkörper in 2 Fällen nachweisen ließen. Agglutinine ließen sich in keinem Serum nachweisen, ebenso erhielt er negative Resultate bei Epididymitis und chronischer Gonorrhoe. Torrey (7) kam, wie erwähnt, auf Grund seiner Agglutinationsergebnisse zu der Ansicht, daß die Gonokokkenfamilie verschiedenartig sei. Nach Watabiki (6) tritt Agglutination mit Serum von Patienten, die an akuter Gonorrhoe leiden, nicht ein, während das Serum von chronisch Kranken (Orchitis, Prostatitis etc.) die Reaktion gelegentlich hervorrufen kann. Nach Finkelstein (5) hat die Agglutination bei Gonorrhoe im Gegensatz zur Komplementbindung keine Bedeutung.

Vom Verfasser wurden im ganzen 33 Seren untersucht; 2 Seren stammten von demselben Patienten und waren mit einwöchentlichem Intervall entnommen. Die Technik war einfach: Die als Impfstoffe verwandten Aufschwemmungen von Gonokokkenreinkulturen, die nur durch 24-stündigen Brutschrankaufenthalt bei 37 Grad in physiologischer Kochsalzlösung abgetötet und mit 0,5 Proz. Karbolsäure versetzt waren und im Kubikzentimeter etwa 100 Millionen Keime enthielten, wurden in Mengen von 0,5 ccm mit jeweils 1,0 ccm des fraglichen Serums in passender Verdünnung zusammengebracht. Es wurden auf diese Weise die Verdünnungen 1:30, 60, 120

(und höher im Bedarfsfall) hergestellt. Die Röhrchen wurden nach 10-stündigem Aufenthalt im Brutschrank unter Vergleich mit der jeweils angesetzten Kochsalzkontrolle nachgesehen. Nebenher gingen Agglutinationsversuche mit Normalserum und mit Verwendung lebender Kulturen. Agglutination mit Normalserum wurde bei einwandfreien Kochsalzkontrollen nicht beobachtet, nur in einem Falle reagierte ein Normalserum mit einem Stamm bis zur Verdünnung 1:60, während es die übrigen 21 mit ihm zusammengebrachten Stämme unbeeinflußt ließ. Agglutinationsversuche mit lebenden Kulturen entsprachen im allgemeinen den Resultaten mit abgetöteten Kulturen, doch war die Neigung zu spontaner Verklumpung bei frischen Kulturen sehr störend und es dementsprechend schwer, einwandfreie Kontrollen zu erhalten, so daß die Verwendung abgetöteter Gonokokkenkulturen vorteilhafter erschien.

In 5 Fällen war es zunächst möglich, Patientenseren mit dem jeweils eigenen Stamm zu agglutinieren. In 4 dieser Fälle sahen wir stärkste Agglutination, die bis zur Verdünnung 1:120 große, makroskopisch ohne weiteres sichtbare Klumpungen hervorrief und bei Lupenbetrachtung auch in erheblicher Verdünnung (1:480) noch deutlich war, Reaktionen, wie wir sie bei Agglutination derselben Seren mit anderen Stämmen in gleicher Stärke nie zu sehen bekamen. Im 5. Fall, der eine 12 Monate bestehende chronische Gonorrhoe betraf, war die Reaktion weniger deutlich, aber vorhanden.

Der Gehalt der untersuchten 33 Seren an Agglutininen war durchaus schwankend. In 4 Fällen erfolgte nur andeutungsweise Agglutination, in einem weiteren Falle (Dzi., Urethritis post. chron.) schienen Agglutinine überhaupt zu fehlen. Nicht unmöglich erschien es aber, daß sich in vorstehenden Fällen bei Verwendung noch zahlreicherer Gonokokkenstämme, als sie uns zur Verfügung standen, vielleicht doch noch stärkere Agglutination hätte erreichen lassen. Hiermit würde es gut übereinstimmen, daß Jötten von 27 untersuchten Stämmen nur 20 in Gruppen einreihen konnte und 7 Stämme ungruppiert bleiben mußten, sodaß also ein eventuelles Vorliegen von noch mehr Gruppen anzunehmen wäre. Die weitaus größte Zahl der Seren agglutinierte einen oder noch öfters eine Anzahl von Stämmen deutlich, während eine weitere Anzahl von

Stämmen unbeeinflußt blieben. Andererseits sahen wir Seren, die fast alle herangezogenen Stämme stark agglutinierten, so agglutinierte z. B. Serum Kön. sämtliche mit ihm zusammengebrachten Gonokokkenstämme. Die Anamnese ergab in diesem Fall, daß 6-malige Infektion innerhalb der letzten Jahre vorgelegen hatte; auch wird man in derartigen Fällen das Uebergreifen auf die dem krankmachenden weniger identischen Stämme sehr zu berücksichtigen haben, zumal da die Höhe der Agglutination bei den einzelnen Stämmen durchaus verschieden war. Dauer und Verlauf der Erkrankung schienen insofern zum Gehalt an Agglutininen in Beziehung zu stehen, als in den untersuchten 33 Seren, die ja sämtlich chronische Erkrankungen betrafen, nur in 5 Fällen stärkerer Agglutiningehalt fehlte, doch gehörte z. B. ein so langwieriger Fall wie Fall Köp. (seit April 1919 dauernd wechselnde Gonokokkenbefunde, z. Zt. zum 5. Mal in Krankenhausbehandlung, Gonokokken ++++) zu den schwach agglutinierenden Seren. Eine Uebereinstimmung von Seren hinsichtlich ihres Agglutinationsverhaltens zu den verschiedenen Stämmen war nicht festzustellen, vielmehr hatten alle 33 Seren ihre zum Teil erheblich voneinander abweichenden Eigenheiten. Einzelne Stämme, so die Stämme 29 und 30 wurden jedoch annähernd gleichmäßig von allen Seren agglutiniert, so daß eine nahe Verwandtschaft, vielleicht auch Identität dieser Stämme nicht unwahrscheinlich erscheint. Eine so scharfe Gruppierung der Stämme, wie sie Jötten vermittels Tierimmunserum-Agglutination fand, war bei Agglutination mit menschlichem Serum von vornherein nicht zu erwarten. Die Verhältnisse liegen eben doch bei der menschlichen Gonorrhoe weit komplizierter als beim Tierserum, es sei nur an das Vorkommen der Superinfektion und an die Möglichkeit der gleichzeitigen Infektion mit verschiedenen Stämmen erinnert. Auch der bei den Tierimmunseren ungleich höher liegende Endtiter, der fast immer eine Abgrenzung der nur mitagglutinierten Stämme ermöglicht, ist zu berücksichtigen. Als festgestellt darf jedenfalls gelten, daß in der weit überwiegenden Mehrheit der untersuchten Seren Agglutinine vorhanden waren, die sich verschiedenen Gonokokkenstämmen gegenüber durchaus verschieden

Tabelle I. Agglutinationsversuche.

Stamm	Serum Ro.	Tru.	Ull.	Reu. 24. I.	Reu. 3. II.	Kra.	Sem.	Mat.	Krä.	Bro.	Uhl.	Rin.	Kop.	Ros.	Rit.	Ler.
1	—	60 +	60 + / 120 ±	—	—	—	—	60 ±	—	—	—	30 ±	—	30 +	—	—
2	—	—	—	—	—	—	—	120 +	—	120 +?	30 +?	—	120 ±	60 ±	—	—
3	—	—	120 ±	—	—	30 ±	—	30 +	—	30 ±	.	.	.	.	.	.
4	—	30 +	—	—	—	.	.	30 ±	—	30 ±	.	.	.	.	.	.
5	—	—	—	—	—	—	30 ±	—	—	60 + / 120 ±	—	—	30 ±	30 ±	—	30 ±
6	60 +	60 +	—	—	—	—	30 ±	—	—	120 +	—	—	120 ±	60 ±	60 + / 120 ±	60 ±
7	30 +	—	—	—	—	—	—	30 ±	30 ±	120 +	—	—	30 + / 60 ±	—	.	.
9	30 +	30 +	—	—	—	—	—	—	—	60 +	—	—	30 ±	60 +	—	30 +
10	—	120 +	—	30 +	30 +	—	120 +	—	—	60 ±	60 + / 120 ±	30 + / 60 ±	30 +	—	—	30 ±
11	—	—	—	—	—	30 +	60 +	60 +	—	—	—	30 ±	60 ±	60 +	60 + / 120 ±	—
12	30 +	—	—	—	30 ±	—	60 + / 120 ±	60 +	120 +	60 + / 120 ±	—	60 ±	60 +	120 ±	60 +	—
13	—	60 +	—	—	—	30 ±	—	—	—	.	.	.	.	.	.	.
14	—	—	30 ±	—	—	60 + / 120 ±	—	—	—	—	30 +	—	—	60 + / 120 ±	120 ±	30 ±
15	120 +?	120 +?	—	—	—	120 +	30 +	—	120 +	30 +	30 +	—	30 +	—	30 ±	—
18	120 +	120 +	—	60 + / 120 ±	60 + / 120 ±	—	60 +	—	—	60 ±	—	—	30 ±	30 ±	60 +	30 ±
20	30 ±	—	—	—	—	—	—	—	—	60 +	30 +	30 ±	60 +	60 +	—	60 + / 120 ±
21	30 ±	—	30 ±	30 +	60 +	30 + ?	—	—	—	30 ±	60 +	30 ±	30 ±	30 +	—	60 + / 120 ±
22	.	.	.	.	.	.	.	—	—	—	—	—	—	60 + / 120 ±	60 + / 120 ±	—
23	.	.	.	.	.	.	.	—	—	—	—	—	—	30 +	—	30 +
24	.	.	.	.	.	.	.	+ 60	—	—	—	—	—	30 ±	30 ±	—
25	.	.	.	.	.	.	.	.	.	60 ±	—	—	—	60 ±	—	—
26	.	.	.	.	.	.	.	.	.	120 +	—	—	30 ±	120 +	60 ±	—
27	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	30 +	30 ±	—	—
28	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	30 +	—	—	—
29	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	30 ±	—

Zeichenerklärung: + gute Agglutination, ± schwache „, — keine „ — die vorstehende Zahl gibt den Verdünnungsgrad des Serums an.

? NaCl-Kontrolle nicht einwandfrei.
Punktierte Felder bedeuten nicht ausgeführte Agglutination, da Stamm nicht vorhanden bzw. eingegangen.

Stamm	Bog.	Ko.	Lau.	Pau.	Dzi.	Köp.	Kön.	Mar.	Kap.	Pfef.	Mäd.	Tim.	Kro.	Wes.	Kei.	Fri.	Sar.
1	—	—	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
2	—	—	30 ±	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
5	—	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
6	—	30 ±	—	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
9	—	—	—	60 ±	—	30 ±	60 + 120 ±	120 ±	—	—	—	—	—	—	·	·	·
10	—	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
11	—	30 ±	—	—	30 ± ?	—	60 + 120 ±	60 + 120 ±	60 ±	60 ±	—	30 ±	30 + 60 ±	30 + 60 ±	—	—	30 +
12	—	60 ±	60 ± ?	60 ±	—	30 ±	120 +	60 + 120 ±	—	60 ± ?	—	60 ± ?	—	—	·	·	·
13	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
14	—	30 ±	—	—	—	—	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
15	—	—	—	—	—	—	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
18	—	—	30 ±	—	—	60 ±	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
20	—	30 +	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
21	120 ±	—	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
22	—	—	—	—	—	30 ±	60 ± ?	30 ±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
23	—	—	—	—	—	—	60 ±	30 ±	—	—	—	—	60 +	30 +	30 ±	—	—
24	—	—	—	—	—	30 +	60 +	60 +	—	—	30 ±	—	120 +	—	—	30 ±	—
25	—	—	—	—	—	30 + 60 ±	120 +	120 +	30 ±	—	30 +	—	·	·	·	·	·
26	—	30 ±	30 ±	—	—	30 + 60 ±	60 + 120 ±	120 +	—	—	—	—	·	·	·	·	·
27	—	—	—	120 ±	—	30 ±	60 + 120 ±	60 + 120 ±	120 ±	120 +	60 ± ?	120 ±	—	—	30 ± ?	—	—
28	120 +	—	—	—	—	30 ±	120 ±	30 +	60 ±	30 ±	30 ±	—	30 ±	120 ±	—	30 +	—
29	—	—	60 + 120 ±	30 ±	—	60 ±	120 ±	60 ±	30 ±	—	30 ±	—	60 ±	120 +	—	—	30 ±
30	·	·	120 +	60 ±	30 ±	60 ±	60 +	120 ±	60 ±	—	60 + 120 ±	30 +	—	60 + 120 ±	60 ±	—	30 ±
31	·	·	30 + 60 ±	—	—	30 ±	60 ±	60 ±	—	—	60 ±	—	—	30 ±	30 ±	60 ±	—
32	·	·	120 ±	—	—	60 ±	60 ±	30 ±	—	—	—	—	60 ±	120 ±	—	60 ±	30 ±
33	·	·	·	·	—	30 ±	60 ±	30 ±	—	—	60 ± ?	60 ±	—	—	60 + 120 ±	30 ±	30 ±
34	·	·	·	·	·	·	30 ±	30 ±	60 ±	—	30 ±	60 ±	60 + 120 ±	—	30 ±	—	—
35	·	·	·	·	·	·	·	·	—	—	120 +	30 +	120 +	—	—	30 +	—
36	·	·	·	·	·	·	·	·	60 ±	60 ±	30 +	60 ±	30 + 60 ±	60 + 120 ±	—	—	30 ±
37	·	·	·	·	·	·	·	·	30 +	—	120 +	30 +	120 +	—	120 ±	30 + 60 ±	30 + 60 ±

verhielten, so daß auch nach diesen Versuchen eine Differenzierung der Gonokokkenfamilie wahrscheinlich ist. 10 Seren agglutinierten einen bestimmten Stamm weit stärker als alle anderen Stämme, so daß in diesen Fällen eine besondere Affinität des die Agglutinine ausgelöst habenden Gonokokkenstammes zu einem unserer Stämme unzweifelhaft war. Besonders instruktiv war in dieser Beziehung Fall Bog., dessen Serum von 12 Gonokokkenstämmen Stamm 28 noch in Verdünnung 1:120 sehr erheblich agglutinierte, mit einem weiteren Stamm nur andeutungsweise Agglutination ergab und die übrigen 19 Stämme unbeeinflußt ließ. Bezüglich der Einzelergebnisse der Agglutination sei auf Tabelle I verwiesen.

Komplementbindung.

Nachdem das Komplementbindungsvermögen des Gonorrhoikerserums 1906 von Müller und Oppenheim (11) und von Bruck in Fällen von Arthritis gonorrh. bzw. Adnexerkrankung festgestellt worden war, ist dieses Phänomen seither von zahlreichen Untersuchern nachgeprüft worden. Bald beschränkte man sich nicht mehr auf Fälle gonorrhoischer Allgemeinerkrankungen, sondern untersuchte auch Fälle chronischer Urethralblennorrhoe. Meakins (12) fand in 3 von 5 gonorrhoischen Arthritiden positive Reaktion. Im Serum unkomplizierter Gonorrhoen konnte Bruck keine komplementbindenden Substanzen nachweisen; Watabiki (6) gibt später an, auch bei chronischer Urethralblennorrhoe positive Reaktion erzielt zu haben, von 6 Fällen reagierten 3 positiv; Kontrollseren von Patienten mit anderen Krankheiten gaben stets negative Reaktion. Er kam zu dem Endergebnis, daß die Seren von Tripperkranken in manchen Fällen, doch nicht regelmäßig, spezifische Ambozeptoren enthalten, die auch nach Abheilen noch vorhanden sein können. Irgendwelche Beziehungen zwischen Agglutination und Komplementbindung vermochte er nicht festzustellen. Nencioni (13) untersuchte 33 Seren; von 16 Urethritisfällen ergaben 3 inkomplette Hämolyse; von 7 Epididymitisfällen 2 negative, 4 inkomplette, 1 positive Hämolyse; von 7 Arthritisfällen 3 negative, 2 inkomplette, 1 positive Hämolyse; von 3 fieberhaften Urethritisfällen 2 negative, 1 positive Hämolyse. Dembska

(14), der mit Seren von gynäkologischen Erkrankungen arbeitete, kommt zur folgenden Einteilung:

1) Fälle mit initialen Erscheinungen: schwache Reaktion.
2) Frische Adnexerkrankungen und Peritonitis: starke Reaktion.
3) Ueber 2 Wochen alte Fälle: totale Reaktion.

Finkelstein (5) erhielt mit 58 chronisch Urethritisfällen sogar 58mal, als in 100 Proz. der Fälle positive Reaktion; auch er ist der Meinung, daß die Agglutination bei Gonorrhoe im Gegensatz zur Komplementbindung keine Bedeutung habe. Bedingung zum Nachweis sind nach ihm Gonokokkenantiforminextrakte. Mit Antiforminextrakten arbeitete auch Merkurjew (15), er fand Antikörper sowohl bei komplizierter als auch unkomplizierter Gonorrhoe, doch reagierten ihm von 17 Fällen von Gonorrhoe „in der Anamnese" und chronischen Formen nur 2 positiv, 2 schwach positiv, 3 andere negativ.

Für den Verfasser kam es nun darauf an, die Komplementbindungsfähigkeit einer Anzahl Gonorrhoikerseren daraufhin zu untersuchen, ob die Stärke der Komplementablenkung bei Verwendung verschiedener Stämme verschieden stark sei, und weiter, ob sich vielleicht Beziehungen zwischen Komplementablenkung und Agglutination in dem Sinne ergäben, daß Seren, die einen bestimmten Stamm agglutiniert hatten, mit Extrakten aus dem gleichen Stamm besonders starke Komplementablenkung ergäben. Als Antigene dienten Extrakte aus Gonokokkenreinkulturen, die uns in den filtrierten Impfstoffen zur Verfügung standen, in Mengen von 0,5 ccm, die vorher auf Eigenhemmung kontrolliert worden waren; in einem Teil der Fälle prüften wir vergleichsweise auch die Reaktion bei Verwendung von Gonokokkenantiforminauflösungen (Technik der Herstellung vgl. K. Altmann und I. H. Schultz, Zeitschrift für Immunitätsforschung, 1909). Auch uns bestätigte sich die größere Empfindlichkeit der Reaktion bei Verwendung von Antiforminauflösungen, doch schien die Methode geeignet, etwa vorhandene Unterschiede zugunsten einer kompletten Hemmung der Hämolyse zu verändern, so daß wir sie nicht weiter anwandten. Die Methodik der Reaktion war die allgemein übliche der Wassermannschen Reaktion; bei größeren verfügbaren Serummengen wurde die Reaktion mit allen zur

Tabelle II.

Vergleichende Uebersicht über Ergebnisse von Agglutination und Komplementbindung.

Zeichenerklärung: ++++ starke Hemmung, ++ schwache Hemmung, + ganz schwache Hemmung, 0 Hämolyse.

Serum	Agglutination (stark)	Komplementbindung	Agglutination (schwach)	Komplementbindung	Keine Agglutination	Komplementbindung
Tru.	10 (1:120 +)	0,2 +; 0,1 0	.	.	.	.
	13 (1: 60 +)	0,2 0	.	.	.	.
	15 (1:120 +)	0,2 +; 0,1 0	.	.	.	.
	18 (1:120 +)	0,1 +++	.	.	.	.
Reu.	10 (1: 30 +)	0,2 0	.	.	.	.
	18 (1: 60 +)	0,2 ++; 0,1 +	.	.	.	.
	21 (1: 60 +)	0,2 0	.	.	.	.
Mat.	2 (1:120 +)	0,1 ++	.	.	.	.
	3 (1: 30 +)	0,1 ++	.	.	18	0,1 +
	11 (1: 60 +)	0,1 +	.	.	.	.
	24 (1: 60 +)	0,1 ++	.	.	.	.
Krä.	.	0,3 ++++	.	.	2	0,3 +; 0,2 +; 0,1 +
	12 (1:120 +)	0,2 ++	.	.	18	0,3 +++; 0,2 ++; [0,1 +
	.	0,1 +	.	.	.	.
Kra.	11 (1: 30 +)	0,2 ++; 0,1 0	.	.	2	0,2 0; 0,1 0
	14 (1: 60 +)	0,2 + ; 0,1 0	.	.	18	0,2 +; 0,1 +
Sem.	10 (1:120 +)	0,2 ++	.	.	.	.
	12 (1: 60 +)	0,2 +	6 (1: 30 ±)	0,2 ++	2	0,2 +
	18 (1: 60 +)	0,2 ++	.	.	.	.
Lau.	29 (1: 60 +)	0,1 ++	.	.	28	0,1 +
	30 (1:120 +)	0,1 +	.	.	.	.
	31 (1: 30 +)	0,1 +	.	.	.	.
Ko.	.	.	.	.	9	0,2 +++; 0,1 +++
	.	.	.	.	22	0,1 +++
	.	0,2 ++++	12 (1: 60 ±)	0,2 ++++; 0,1 ++	23	0,1 ++
	20 (1: 30 +)	0,1 +++	26 (1: 30 ±)	0,2 +++ ; 0,1 ++	24	0,1 ++
	.	0,05 0	.	.	27	0,1 +++

Agglutination sämtlich 1:30 negativ.

Ros.	11 (1: 60 +)	0,1 +	.	.	.		.
	20 (1: 60 +)	0,1 +	.	.	28		0,1 +
	22 (1: 60 +)	0,1 0	.	.	.		.
	26 (1:120 +)	0,1 +	.	.	.		.
Rit.	12 (1: 60 +)	0,1 +++	11 (1:120 ±)	0,1 +++	2		0,1 +++
	22 (1: 60 +)	0,1 ++	24 (1: 30 ±)	0,1 +	9		0,1 ++
Kön.	12 (1:120 +)	0,1 ++	.	.	.		.
	24 (1: 60 +)	0,1 +	23 (1: 60 ±)	0,1 +	.		.
	25 (1:120 +)	0,1 +++	.	.	.		.
Bog.	.	.	.	.	9		0,1 0
	28 (1:120 +)	0,2 +; 0,1 0	21 (1:120 ±)	0,2 +; 0,1 +	11		0,1 0
	.	.	.	.	12		0,1 0
Pfef.	.	0,2 ++	28 (1: 30 ±)	0,1 0	9		0,2 0
	27 (1:120 +)	0,1 +	11 (1: 60 ±)	0,1 +	22		0,2 0
	.	.	36 (1: 60 ±)	0,1 0	23		0,2 0
	.	.	.	.	24		0,2 0
	.	.	.	.	.		.
Mar.	11 (1: 60 +)	0,1 +	22 (1: 30 ±)	.	.	Agglutination sämtlich 1:30 negativ	.
	12 (1: 60 +)	0,1 ++	23 (1: 30 ±)	0,1 +	.		.
	25 (1:120 +)	0,1 ++	.	0,1 +	.		.
	24 (1: 60 +)	0,1 +	.	.	.		.
Ler.	9 (1: 30 +)	0,1 0	.	.	11		0,1 +
	20 (1: 60 +)	0,1 +	.	.	12		0,1 0
	23 (1: 30 +)	0,1 +	.	.	28		0,1 0
Uhl.	20 (1: 30 +)	0,05 0	.	.	11		0,1 ++; 0,05 0
	.	.	.	.	27		0,05 0
Köp.	.	.	9 (1: 30 ±)	0,2 0; 0,1 0	.		.
	.	.	12 (1: 30 ±)	0,2 ++; 0,1 0	.		.
	.	.	22 (1: 30 ±)	0,2 0; 0,1 0	.		.
	.	.	27 (1: 30 ±)	0,2 +; 0,1 0	.		.
	24 (1: 30 +)	0,2 0; 0,1 0	28 (1: 30 ±)	0,2 0; 0,1 0	11		0,2 +; 0,1 0
	25 (1: 30 +)	0,2 +++	29 (1: 60 ±)	0,2 ++++; 0,1 0	23		0,2 +; 0,1 0
	.	0,1 0	30 (1: 60 ±)	0,2 +; 0,1 0	.		.
	.	.	31 (1: 30 ±)	0,2 +++; 0,1 0	.		.
	.	.	32 (1: 60 ±)	0,2 ++++; 0,1 0	.		.

Tabelle II. Fortsetzung.

Serum	Agglutination (stark)	Komplementbindung	Agglutination (schwach)	Komplementbindung	Keine Agglutination	Komplementbindung
Mäd.	35 (1 : 120 +)	0,1 +	.	.	11	0,1 +
	37 (1 : 120 +)	0,1 0	24 (1 : 30 ±)	0,1 +	32	0,1 +
Tim.	27 (1 : 60 +)	0,1 ++++ ; 0,05 ++++	.	.	9	0,1 +
	30 (1 : 30 +)	0,1 +	34 (1 : 60 ±)	0,1 ++	22	0,1 +
	35 (1 : 30 +)	0,1 ++	36 (1 : 60 ±)	0,1 +	23	0,1 +
	37 (1 : 30 +)	0,1 +++	.	.	24	0,1 +
Kap.	.	.	27 (1 : 120 ±)	0,2 + ; 0,1 0	24	0,2 + ; 0,1 0
Kro.	34 (1 : 60 +)	0,1 0	.	.	27	0,1 0
	37 (1 : 120 +)	0,1 0	.	.	30	0,1 0
Wes.	11 (1 : 30 +)	0,1 0	.	.	9	0,1 0
	23 (1 : 30 +)	0,1 +	.	.	22	0,1 0
	29 (1 : 120 +)	0,1 +	31 (1 : 30 ±)	0,1 0	24	0,1 0
	30 (1 : 60 +)	0,1 0	.	.	27	0,1 0
	.	.	.	.	33	0,1 0
Ull.	.	.	3 (1 : 120 ±)	0,1 0	.	.
	.	.	14 (1 : 30 ±)	0,1 0	.	.
Rin.	.	.	11 (1 : 30 ±)	0,2 ++ ; 0,1 +	2	0,2 + ; 0,1 +
	.	.	12 (1 : 60 ±)	0,2 + ; 0,1 +	22	0,2 + ; 0.1 +
	.	.	20 (1 : 30 ±)	0,2 + ; 0,1 +	23	0,2 0 ; 0,1 0
Pau.	.	.	12 (1 : 60 ±)	0,2 + ; 0,1 +	.	.
	.	.	27 (1 : 120 ±)	0,2 + ; 0,1 0	11	0,2 + ; 0.1 +
	.	.	29 (1 : 30 ±)	0,2 + ; 0,1 +	28	0,1 0
	.	.	30 (1 : 60 ±)	0,2 + ; 0,1 +	.	.
Le Do.	2 (1 : 120 +)	0,1 ++	9 (1 : 30 ±)	0,1 +	23	0,1 0
	30 (1 : 30 +)	0,1 +	11 (1 : 30 ±)	0.1 +	27	0,1 0
	33 (1 : 120 +)	0,1 0	29 (1 : 60 ±)	0,1 0	28	0,1 +
	39 (1 : 60 +)	0,1 +++	46 (1 : 30 ±)	0,1 0	34	0,1 0
	42 (1 : 120 +)	0,1 +++	.	.	.	.

Keine Agglutination: Agglutination sämtlich 1 : 30 negativ.

Verfügung stehenden Extrakten, bei kleinen Serummengen mit Extrakten aus stark, schwach und garnicht agglutinierten Gonokokkenstämmen vorgenommen. In geeigneten Fällen wurde auch die Reaktion mit 0,2 bzw. 0,05 ccm des Patientenserums geprüft. Die Kontrollversuche mit Normalserum ließen niemals eine Hemmung der Hämolyse erkennen. Als Zeit, nach welcher die Ablesung erfolgte, wählten wir auf Grund vergleichender Versuche 2 Stunden. Zur Untersuchung herangezogen wurden im ganzen 30 Seren, von denen nur 2 (je ein Fall von Adnexerkrankung und chronischen Urethritis) jede Komplementbindung vermissen ließen. In 4 Fällen konnte Serum in seinem Verhältnis zum eigenen Stamm untersucht werden, stets zeigte sich auch bei kleinen Serummengen (0,05 ccm) eine komplette Hemmung der Hämolyse, wie sie sich mit gleich kleinen Serummengen mit anderen Stämmen nicht erreichen ließ. Besonders erwähnt sei, daß auch das Serum Jo., das als einziges den eigenen Stamm nur schwach agglutiniert hatte, beim Komplementbindungsversuch mit seinem Stamm komplette Hemmung ergab. Es erhebt sich nun zunächst die Frage, ob diejenigen Seren, bei denen bei der Agglutination ein hoher Gehalt an Agglutininen festgestellt worden war, auch ganz allgemein einen hohen Gehalt an komplementbindenden Substanzen enthielten. Die Untersuchungsergebnisse zeigt folgende Tabelle:

Agglutinin-gehalt	Zahl der Seren	davon auf K. B. unter-sucht	Komplementbindungsvermögen			
			fehlend	wenig	stark	sehr stark
fast fehlend	3	2	—	2	—	—
schwach	3	3	—	2	—	1
stark	8	6	—	3	3	—
sehr stark	17	15	—	4	6	4

In Uebereinstimmung mit den Agglutinationsversuchen zeigte sich auch hier, daß sich die einzelnen Seren gegen Extrakte aus verschiedenen Gonokokkenstämmen verschieden verhielten. Eine vergleichsweise Zusammenstellung der Ergebnisse beider Reaktionen enthält Tabelle II. Bei ihrer Zusammenfassung kommt man zu folgendem Ergebnis: Es ergaben die stärkste Komplementbindung

1. der am höchsten agglutinierte Stamm in 10 Fällen,
2. ein anderer stark agglutinierter Stamm in 1 Fall,
3. ein schwach agglutinierter Stamm in 1 Fall,
4. ein nicht agglutinierter Stamm in 3 Fällen,
5. in 11 Fällen endlich waren Unterschiede im Verhalten zu hoch und nicht agglutinierte Stämme nicht festzustellen.

Es zeigte sich also, daß der Agglutination eine größere Spezifizität als der Komplementbindungsreaktion zukommt, insbesondere ergab sich bei Seren mit starkem Gehalt an komplementbindenden Substanzen eine Neigung zur Reaktion mii allen, also auch den nicht agglutinierten Stämmen.

Präzipitation.

Literaturangaben über die Anwesenheit spezifischer Präzipitine im Gonorrhoikerserum liegen nur spärlich vor. Bruck konnte in keinem der von ihm untersuchten Seren Präzipitine nachweisen. Nach Torrey (7) ist die Präzipitationsreaktion mit Gonokokkenextrakten weniger befriedigend als die Agglutination. Watabiki (6) fand, daß nur im Serum von Immuntieren Präzipitine nachweisbar sind, nicht dagegen in Krankenseren.

Verfasser untersuchte 17 Seren vermittels der Präzipitationsreaktion und verwandte als Antigene Extrakte aus etwa 30 verschiedenen Gonokokkenreinkulturen. Die Versuchstechnik war, daß jeweils 0,1 ccm Serum mit 0,9 ccm des filtrierten Gonokokkenextraktes in steigender Verdünnung (1:10, 100, 1000, 10000) vorsichtig überschichtet wurde. In jedem Falle wurde eine Kontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung angesetzt, nebenher gingen Versuche mit Normalserum sowie mit Extrakten aus einer Staphylo- und Streptokokkenreinkultur. Trotz Verwendung aller zur Verfügung stehenden Gonokokkenstämme war nur in der Minderzahl der Falle zu verwertbaren Resultaten zu gelangen, sodaß höchstens von einer ganz bedingten Brauchbarkeit der Präzipitationsreaktion gesprochen werden kann. Die Resultate im einzelnen waren die, daß von 17 untersuchten Seren 4 eine brauchbare Reaktion ergaben, 7 Seren sich als unbrauchbar erwiesen, 3 Seren fragliche, aber vielleicht bedingt verwertbare (s. u.) Resultate ergaben und endlich 3 Seren absolut negativ sich verhielten. Die hohe Zahl der für die Reaktion als unbrauchbar befundenen Seren rührt

Tabelle III.

Auszug aus den Protokollen über Präzipitationsversuche.

Serum	NaCl Kontrolle	Staphylokokken Kontrolle	Streptokokken Kontrolle	Zahl der Go.-Stämme, mit denen Reaktion negativ	Positive Präzipitation	Bemerkungen
Ull.	—	—	—	3	Stamm 1: 1:100 + „ 3: 1:1000 + „ 14: 1:1000 +	—
Trum.	—	—	—	5	—	—
Reu.	+	+	+	(4 +)	.	Unbrauchbar wegen positiv. Kontroll.
Mat.	+	+	+	(1 +)	.	„ „ „ „
Ros.	—	1:100 ±	1:100 ±	(6 ±)	Stamm 6: 1:100 +, 1:1000 + „ 18: 1:1000 + „ 21: 1:1000 +	Resultate bedingt verwertbar
Rit.	±	±	±	(8 ±)	—	Unbrauchbar wegen positiv. Kontroll.
Kop.	+	+	+	(6 +)	Stamm 7: 1:10 ++ „ 14: 1:1000 ++	Resultate bedingt verwertbar
Mor.	—	—	—	.	eigener Stamm: 1:10–1:100 000 +	Versuche mit anderen Stämmen mangels Serums nicht ausgeführt
Fri.	+	.	.	(6 +)	.	Unbrauchbar wegen positiv. Kontroll.
Mär.	+	.	.	(6 +)	.	„ „ „ „
Her.	+	.	.	(5 +)	.	„ „ „ „
Kei.	+	—	—	13	Stamm 16: 1:10 +	—
Möl.	—	—	—	9	Stamm 11, „ 16, „ 28, „ 29, „ 31, „ 51 } 1:10 ±	—
Sar.	—	—	—	14	—	—
Her.	±	±	±	8	Stamm 34: 1:10 +, 1:100 +	Resultate bedingt verwertbar
Joh.	—	—	—	9	—	Reaktion auch mit eig. Stamm negativ
Tau.	+	.	.	(9 +)	.	Unbrauchbar wegen positiv. Kontroll.

davon her, daß in all diesen Fällen einwandfrei negative Kontrollen nicht zu erhalten waren, da die Seren schon bei der Ueberschichtung mit 0,85-proz. Kochsalzlösung eine präzipitatähnliche Ausfällung an der Berührungsfläche erkennen ließen. Diese Beobachtung veranlaßte dazu, eine Anzahl der dem Institut zur Vornahme der Wassermannschen Reaktion zugesandten Seren in gleicher Weise mit physiologischer Kochsalzlösung zu überschichten. Auch hier erschien bei der Mehrzahl der Seren ($^2/_3$) schon nach kurzer Zeit die erwähnte präzipitatähnliche Ausfällung. Die Verwendung von 0,65-proz. Kochsalzlösung und von Ringerlösung änderte hieran nichts. In die Rubrik „unbrauchbar“ mußten weiter die Seren eingereiht werden, die mit Extrakten aus Staphylo- bezw. Streptokokken positive Reaktionen zeigten, bei denen also hinsichtlich der Spezifizität der Reaktion Zweifel bestehen mußten. Die Zahl der negativ reagierenden Seren wurde durch die beiden vorerwähnten Ursachen naturgemäß sehr eingeschränkt. In allen 3 Fällen, in denen die Präzipitation negativ ausfiel, ließen sich Agglutinine nachweisen; eines dieser Seren wurde auch mit dem eigenen Stamm präzipitiert, auch in diesem Fall war das Resultat negativ. Als bedingt verwertbar sind die Seren bezeichnet, die zwar nicht vollkommen negative Kontrollen aufzuweisen hatten, bei denen sich aber bei Verwendung spezifischer Antigene eine entschieden weit deutlichere Reaktion als in den Kontrollröhrchen zeigte. Von diesen 3 Seren reagierte 1 mit 3 verschiedenen, 1 mit 2 und 1 mit 1 Stamm deutlich, während die übrigen Extrakte die Reaktion ebenso wie die Kochsalzkontrollen angedeutet erkennen ließen. Beziehungen zwischen Agglutination und Präzipitation waren nicht nachzuweisen, wie ja überhaupt die Resultate dieser Serenreihe mangels absolut einwandfreier Kontrollen nur mit größter Vorsicht zu verwerten sind. Die 4 brauchbare Resultate gebenden Seren, bei denen die Kontrollen (NaCl-Lösung und Staphylo- bzw. Streptokokkenextrakte) absolut negativ waren, waren mit insgesamt 36 verschiedenen Extrakten angesetzt worden. Zwei dieser Seren reagierten mit je 1 (darunter einmal der eigene Stamm), eines mit 3 und eines mit 6 der Extrakte positiv, keines aber der mit mehreren Stämmen präzipitierten Seren zeigte mit allen ver-

wandten Extrakten positive Reaktion. Abgesehen von dem Serum Mo., das mit dem von ihm erheblich agglutinierten eigenen Stamm auch positive Präzipitation ergab, dessen Verhalten zu anderen Stämmen aber mangels genügender Serummengen nicht untersucht werden konnte, ließen sich Beziehungen zwischen Agglutination und Präzipitation nicht nachweisen. Auch die Höhe der Extraktverdünnungen, bei der die Reaktion am deutlichsten ausfiel, war nicht einheitlich, lag aber zumeist bei den niederen Verdünnungsgraden.

Die unbefriedigenden Resultate führten schließlich zu dem Versuch, ob durch andersartige Herstellung der Antigene vielleicht bessere Ergebnisse zu erreichen seien. Wir wählten daher Filtrate von Gonokokkenaufschwemmungen, die eine Stunde bei 60 Grad gehalten worden waren, als Antigene zu einer zweiten Versuchsreihe und untersuchten 6 Seren unter Verwendung dieser Antigene. Von diesen 6 Seren fielen 2 infolge positiver Kontrollen aus, die übrigen 4 Seren verhielten sich durchaus negativ mit einziger Ausnahme eines Röhrchens, in dem Serum Mö. mit Stamm Schu. stark präzipitierte. Agglutinine für Stamm Schu. waren in dem fraglichen Serum nicht nachzuweisen, das Komplementbindungsvermögen mit diesem Stamm konnte mangels genügender Serummengen nicht nachgeprüft werden. Die Resultate der zweiten Versuchsreihe lauteten somit gleich ungünstig wie die der ersten. Nach allen erscheint es uns sehr wahrscheinlich, daß der Präzipitationsreaktion bei Gonorrhoe kein Wert beizulegen ist, zumal ihre Spezifizität hinsichtlich anderer pathogener Keime (Staphylokokken, Streptokokken) nicht über allen Zweifel erhaben ist. Einen Auszug aus den Versuchsprotokollen der 1. Serenreihe enthält Tabelle III.

Zusammenfassung.

Für praktische Gesichtspunkte d. h. serologische Diagnostik des zur Vakzinierung am besten geeigneten Gonokokkenstammes bei alten chronischen Fällen, in denen die Herauszüchtung des eigenen Gonokokkenstammes nicht gelingt, ergeben sich somit folgende Resultate:

1) Die Agglutination ist hinsichtlich ihrer spezifischen Brauchbarkeit allen anderen Methoden überlegen. Bedingung

ist, daß mit genügend zahlreichen Stämmen gearbeitet wird. Lebende Kulturen sind wegen ihrer Neigung zu spontaner Verklumpung zur Agglutination weniger brauchbar als abgetötete.

2) Die Komplementbindungsmethode kann zum Herausfinden des dem krankmachenden Stamm ähnlichen oder identischen Stammes mitherangezogen werden, steht aber der Agglutination an spezifischer Brauchbarkeit nach. Anstellung der Komplementbindung allein genügt nicht. Die Vereinigung beider Reaktionen ist zur Herausfindung passender Stämme das gegebene Verfahren.

3) Die Präzipitation ist nicht zu verwerten.

Ueber praktische Versuche an Gonorrhoekranken mit den durch serologische Methoden herausgefundenen Stämmen hat Jötten (Dermatologische Wochenschr., 1921, No. 16) berichtet. Weitere Versuche sind im Gange.

Den Herren Geheimrat Prof. Dr. Kruse und Priv.-Doz. Dr. K. W. Jötten ist Verfasser für die wohlwollende Förderung vorliegender Arbeit zu größten Danke verpflichtet.

Literatur.

1) Jötten, Münch. med. Wochenschr., 1920, No. 37. – Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., Bd. 92, H. 1.
2) Bruck, Deutsche med. Wochenschr., 1906, No. 34, und 1909, No. 11.
3) Jundell, Arch. f. Derm., Bd. 39.
4) Scholtz, Arch. f. Derm., Bd. 49.
5) Finkelstein, I. A., und Gerschun, T. M. Practiczesky Wratsch, 1912, No. 10, p. 157—159.
6) Watabiki, Study of compl. fixation in gon. infections. Journ. of inf. dis., Vol. 77, 1910.
7) Torrey, Agglutinins and precipitins in antigon serum. Journ. of med. research, 1908.
8) Vannod, Deutsche med. Wochenschr., 1906, No. 49.
9) Schwartz and Mac Neil, The compl. fixation test in the diagnosis of gon. inf. Ref. Zeitschr. f. Immunitätsf., 1911.
10) Bärmann, Arch. f. Derm., Bd. 77.
11) Müller und Oppenheim, Wiener klin. Wochenschr., 1906, No. 27.
12) Meakins, Meth. of fixat. of compl. in the diagn. of mening. and gonoc. Bull. of John Hopkins Hospital, 1907, No. 18.
13) Nencioni, Tentativi di fissatione del compl. nella blen. Atti Accad. med. Fiorentini, 1910.
14) Dembska, Zur Frage der Serodiagnose bei Gon. Derm. Zeitschr., No. 11.
15) Merkurjew, Serodiagnose der Gon. Ref. Zeitschr. f. Immunitätsf., 1911.

Zeitschrift f. Immunitätsforschung. Originale. Bd. 33. Heft 3.

[Aus dem Hyg.-bakt. Institut des Hauptgesundheitsamtes der Stadtgemeinde Berlin.]

Die Hitzebeständigkeit gebundener Antikörper. (Hämolysinstudien I.)

Von Dr. **Fritz v. Gutfeld.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 30. Juni 1921.)

Kürzlich hat Spät (1) die von Friedberger und Pinczower (2) zuerst aufgerollte Frage der Thermoresistenz gebundener Antikörper einer erneuten Bearbeitung unterzogen. Während Friedberger und seine Mitarbeiter (3) bewiesen zu haben glauben, daß an ihr Antigen verankerte Immunkörper thermostabil sind, scheint aus den Arbeiten von Bessau (4) und Spät (1) das Gegenteil hervorzugehen.

Die Verschiedenheit der Resultate bei Versuchen mit Bakterien und Agglutininen könnte ihre Erklärung auf folgende Art finden. Durch die Arbeiten von Weil, Felix und Mitzenmacher (5) haben wir Kenntnis erhalten von dem Doppeltypus der Rezeptoren bei verschiedenen Bakterien; es gibt koktostabile und koktolabile Rezeptoren. Nun besteht immerhin die Möglichkeit, daß der eine Stamm mehr stabile, der andere mehr labile Rezeptoren hat; ferner sind Unterschiede der von den verschiedenen Autoren benutzten agglutinierenden Sera in ähnlichem Sinne (Herstellung der Sera mittels lebender oder erhitzter Bakterien) vielleicht von Einfluß gewesen.

Friedberger und Jerusalem (6) sehen ferner einen Beweis für die Hitzebeständigkeit gebundener Antikörper darin, daß es gelingt, wirksames Anaphylatoxin durch Einwirkung von Komplement aus gekochten Präzipitaten zu erzeugen. Hieraus läßt sich aber die Koktostabilität des gebundenen Antikörpers (Präzipitin) um deswillen nicht folgern, weil man wirksames Anaphylatoxin auch durch Einwirkung von Komplement auf unbehandeltes Eiweiß gewinnen kann.

Die Bakteriolysin-Versuche bieten infolge der Interferenz des Tierkörpers methodische Schwierigkeiten, die einer Lösung der angeschnittenen Frage nicht förderlich sind.

Hämolysin-Versuche, die schon Friedberger und Pinczower als wünschwenswert bezeichneten, waren deshalb nicht möglich, weil das Antigen (die roten Blutkörperchen) an sich schon durch das Erhitzen seine Bindungsfähigkeit gegenüber Hammelblutimmunhämolysin verliert. Nachdem jedoch durch Forssman koktostabile Hämolysinogene bekannt geworden sind, konnte die Frage erneut mit neuer Methodik angegangen werden.

Meine vor etwa 3 Jahren in anderem Zusammenhang begonnenen Versuche mit Organantiserum gaben mir Veranlassung, auch die Thermoresistenz gebundener Antikörper einer Prüfung zu unterziehen. Die zu meinen Versuchen benutzten Antigene und Antikörper[1]) unterscheiden sich durch ihre besonderen Eigenschaften prinzipiell von denen der anderen Autoren. Eine Verallgemeinerung meiner Ergebnisse auf die Thermoresistenz gebundener Antikörper überhaupt halte ich nicht ohne weiteres für zulässig.

Der Grund, weshalb gerade Organantiserum verwendet wurde, war der, daß das Antigen bekanntlich in hohem Maße koktostabil ist.

Die Erzeugung des Antikörpers sowie seine Verankerung gelingt in gleicher Weise durch frische wie erhitzte (gekochte) Organe bezw. gekochtes Hammelblut. Diese große und konstante Widerstandsfähigkeit der Rezeptorenfunktion gegen Erhitzung und die gleichzeitig bestehende Thermolabilität schienen daher die Prüfung der Thermorresistenzfrage gebundener Antikörper besonders zu erleichtern. Eine Erschwerung wird aber gegenüber den Versuchen mit Agglutininen dadurch bedingt, daß wir es beim hämolytischen Ambozeptor mit einem Rezeptor III. Ordnung im Sinne Ehrlichs zu tun haben; es muß also das Verhalten sowohl der zytophilen als auch das der komplementophilen Gruppe beachtet werden.

---

1) Es ist hier nicht der Ort, auf die von Spät geäußerte Auffassung der Immunkörper als Fermente näher einzugehen; die Tatsache des Gesetzes der Multipla steht der Ansicht des Autors entgegen.

Um völlige Klarheit über die Hitzeresistenz der reagierenden Körper zu gewinnen, habe ich zunächst Organzellen (bzw. Hammelblut) sowie Organantiserum unter verschiedenen thermischen Bedingungen geprüft.

Die früheren Autoren haben nur auf 100° erhitzte Organ- bzw. Hammelblutaufschwemmungen untersucht und keine Unterschiede im Ambozeptorbildungs- und Bindungsvermögen feststellen können. Ich habe Organe (Pferdeniere) und Hammelblut im offenen Reagenzglas Temperaturen bis zu 200° ausgesetzt (durch Erhitzung im Oelbad) und am wieder erkalteten Material das Bindungsvermögen für Organantiserum in wiederholten Versuchen geprüft. Es stellte sich dabei heraus, daß auch bei 120° die bindende Funktion der Pferdeniere, des ebenfalls geprüften Meerschweinchenfleisches, sowie des Hammelblutes voll erhalten bleibt, während 15 Minuten dauernde Erhitzung auf 160°—180° die bindende Funktion des Hammelblutes abschwächt, 15 Minuten 200° sie aufhebt. Pferdeniere erwies sich resistenter: 15 Minuten 200° keine Verminderung, 30 Minuten 200° Abschwächung, 60 Minuten 200° Aufhebung der bindenden Kraft. Bei den in den Hauptversuchen benutzten, 100° nicht übersteigenden Temperaturen konnte daher mit der Gleichheit des Bindungsvermögens frischen und erhitzten Materials gerrechnet werden.

Eine Prüfung der Thermoresistenz des Organantiserums ergab folgende Werte: 15 Minuten lange Erhitzung auf 62° gibt keine Veränderung, 15 Minuten 65° Abschwächung, 5 Minuten 70° Erlöschen der hämolytischen Funktion.

Die Versuche zur Prüfung der Thermoresistenz des an sein Antigen gebundenen Organantiserums wurden in verschiedener Anordnung ausgeführt, um die einzelnen Fragen gesondert lösen zu können. Prinzipiell war die anzuwendende Technik zunächst folgende: Eine Zellaufschwemmung wird mit Organantiserum beladen, so daß eine vollkommene Absättigung stattfindet. Nach Abschleudern und mehrfachem Waschen wird die abgesättigte Zellaufschwemmung erhitzt und von neuem mit Organantiserum beschickt. Wird dieses gebunden, so muß das zuerst gebundene durch die Erhitzung zerstört worden sein. Wird es nicht gebunden, so war der zuerst verankerte Antikörper trotz der Erhitzung erhalten und verankert geblieben.

Als Kontrolle dient ein zweites Röhrchen, das dieselben Mengen Organaufschwemmung und Ambozeptor erhält, aber nicht erhitzt wird.

Alle hier aufgeführten Versuche sind in mehrfachen Reihen an verschiedenen Versuchstagen mit gleichsinnigem Ergebnis ausgeführt worden.

Versuch I.

Thermoresistenz des an frische Hammelerythrozyten gebundenen heterogenetischen Ambozeptors (Organantiserums). 28. I. 21.

Organantiserum vom 15. I. 21. Titer [1]) am Versuchstage 1 : 900 (1,0 ccm Organantiserumverdünnung + 0,5 ccm 5-proz. Hammelblut + 0,5 ccm 10-proz. Meerschweinchenkomplement).

Hammelblut (gewaschen) vom 27. I. 21.

Fünf Zentrifugenröhrchen (1—5) erhalten je 1 ccm frisches 2-proz. Hammelblut, 1 Röhrchen (Kontrolle) 1 ccm NaCl-Lösung. Röhrchen 1—3 und die Kontrolle werden mit je 1 ccm Organantiserumverdünnung 1:3 = 300 lösenden Dosen (l. D.) versetzt. Nach einstündiger Bindung im Wasserbad bei 37° wird zentrifugiert, die Abgüsse der Röhrchen 1—3 und die Kontrolle anf Ambozeptorgehalt geprüft. Die Abgüsse 1—3 enthalten noch reichliche Mengen hämolytischen Ambozeptor; der Zusatz von 300 l. D. hatte also sicherlich zur Absättigung genügt [2]). Die Sedimente 1—3 werden nun zweimal mit je etwa 10 ccm NaCl gewaschen, dann mit NaCl auf das ursprüngliche Volumen von 1 ccm aufgefüllt. Nun werden die Röhrchen 1, 2 (enthaltend je 1 ccm mit Organantiserum abgesättigtes Hammelblut) und 4, 5 (mit je 1 ccm unbehandelten Hammelbluts) 10 Minuten auf 70° im Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlung erhalten die Röhrchen erneut Organantiserum, und zwar folgendermaßen:

Es enthält:

1	abgesättigtes, dann erhitztes Sediment	+ 1 ccm Org.	1 : 45	= 20 l. D.
2	„ „ „ „	+ 1 „ „	1 : 15	= 60 l. D.
3	„ nicht „ „	+ 1 „ „	1 : 45	= 20 l. D.
4	1 ccm erhitztes 2-proz. Hammelblut	+ 1 „ „	1 : 45	= 20 l. D.
5	1 ccm „ 2-proz. „	+ 1 „ „	1 : 15	= 60 l. D.
6	(Kontr.) 1 ccm NaCl	+ 1 „ „	1 : 45	= 20 l. D.
7	(Kontr.) 1 ccm NaCl	+ 1 „ „	1 : 15	= 60 l. D.

Volumen überall 2 ccm.

1) Sämtliche Versuche, bei denen ein hämolytisches System in Anwendung kam, wurden so ausgeführt, daß zunächst Hammelblut und Ambozeptor einige Zeit (10—15 Minuten) bei Zimmertemperatur in Kontakt blieben und erst dann der Komplementzusatz erfolgte.

2) Der Raumersparnis halber wird dies Resultat nicht in Protokollform wiedergegeben.

Nach einstündiger Bindung im Wasserbad bei 37° wird zentrifugiert, die Abgüsse in fallenden Mengen (jeweils mit NaCl auf 1 ccm aufgefüllt) mit 0,5 ccm 5-proz. Hammelblut und 0,5 ccm 10-proz. Komplement angesetzt. Der hier wiedergegebene Versuch zeigt eine doppelte Ausführung; es sind einmal 20 l. D. (Röhrchen 1, 3, 4, 6), das andere Mal 60 l. D. (Röhrchen 2, 5, 7) vorgelegt worden.

Protokoll I.

Abgußmenge	1	3	4	6	2	5	7
0,5	—	++++	—	++++	+++	+++	++++
0,3	—	+++	—	+++	+	+	++++
0,2	—	+++	—	+++	(±)	(±)	++++
0,1	—	++	—	+++	—	—	++++
0,07	—	+	—	++	—	—	++++

++++ = komplette Lösung. — = komplette Hemmung.

Die Ablesung erfolgte zweimal; zuerst nach 30 Minuten Aufenthalt im 37° Wasserbad, dann nach weiteren 24 Stunden bei Zimmertemperatur. (Hier nur eine Ablesung wiedergegeben.)

Aus dem vorstehenden Protokoll I ist folgendes zu ersehen: Das nach Absättigung mit Organantiserum erhitzte Hammelblut in Röhrchen 1 bindet die dargereichten 20 l. D. komplett, ebenso wie das Röhrchen 4, welches nur erhitztes, aber nicht beladen gewesenes Hammelblut enthält. Im Gegensatz dazu bindet das Sediment 3, welches mit Organantiserum abgesättigt, aber nachher nicht erhitzt wurde, von den 20 l. D. der zweiten Beladung nichts mehr; diese Ambozeptormenge ist praktisch restlos im Abguß nachweisbar, wie der Vergleich mit 6, das nur Ambozeptor enthält, zeigt. Die 3 anderen, mit je 60 l. D. beschickten Röhrchen zeigen dasselbe Resultat; 2 (abgesättigt, dann erhitzt) und 5 (nur erhitzt, nicht beladen gewesen) haben gleiche Mengen des dargereichten Organantiserums (60 l. D.) gebunden; Reihe 7 zeigt (abgekürzt), daß mehr Organantiserum dargereicht wurde, als in den Abgüssen 2 und 5 wieder erscheint; diese beiden Sedimente haben also einen beträchtlichen Teil des Ambozeptors verankert, und zwar das nach Absättigung erhitzte (2) genau so viel wie das unbeladen erhitzte (5). Durch die Erhitzung ist also die Bindungsfähigkeit des abgesättigten Antigens wiederhergestellt worden. Der

Versuch zeigt einwandfrei, daß der an frisches Hammelblut gebundene heterogenetische Ambozeptor durch 10 Minuten lange Erhitzung auf 70° restlos zerstört worden ist[1]).

Der oben beschriebene Versuch I wurde in der Weise wiederholt, daß von vornherein gekochtes Hammelblut zur Verwendung kam. Auch in diesem Versuch, der prinzipiell nichts Neues bringt, zeigte sich der an gekochtes Hammelblut gebundene heterogenetische Ambozeptor als nicht hitzebeständig.

Für das heterogenetische Hämolysin dürfte hiermit die Frage der Hitzebeständigkeit des gebundenen Antikörpers in negativem Sinne entschieden sein. Wir haben gleichwohl versucht, noch auf einem anderen Wege eine Bestätignng der gefundenen Tatsachen zu erbringen. Nach den Versuchen Morgenroths und seiner Schüler (7) findet ein Uebergang des an sein Antigen gebundenen hämolytischen Ambozeptors an Erythrozyten unter gewissen Versuchsbedingungen statt (Transgression). Es sollte nun geprüft werden, ob von einem beladenen Antigen auch nach dessen Erhitzung noch Ambozeptor auf frisch hinzugefügte Blutkörperchen übergeht. War dies der Fall, so hatte keine Zerstörung des gebundenen Antikörpers stattgefunden; blieb die Transgression aus, so bestand die Möglichkeit, daß der gebundene Antikörper zerstört war. Im letzteren Falle waren ergänzende Versuche notwendig, die die Zerstörung mit Sicherheit nachwiesen.

Versuch II. (29. VII. 20.)

Nieren und Nebennieren eines entbluteten Meerschweinchens werden steril zerkleinert, im Mörser verrieben, aufgeschwemmt, durch sterilen Mull filtriert und mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, bis die überstehende Flüssigkeit klar ist. Die Gesamtmenge des Sediments wird mit ca. 80 ccm NaCl-Lösung aufgenommen, so daß eine ziemlich dünne Aufschwemmung entsteht (Antigen). Organantiserum vom 11. VI. 20. Titer am Versuchstage 1:800.

---

1) Es lag nahe, den Versuch zu wiederholen, indem zur ersten Beladung isogenetischer Hammelblutambozeptor, zur zweiten (nach der Erhitzung) Organantiserum verwendet wurde. Solche Versuche habe ich schon vor längerer Zeit ausgeführt. Sie haben zu ganz neuen Fragestellungen geführt, deren technisch nicht leichte Lösung und theoretische Deutung zurzeit noch Gegenstand der Bearbeitung bilden.

Sechs Röhrchen werden in folgender Weise beschickt:

Röhrchen 1 und 2 je 1 ccm Nierenaufschwemmung roh,
„ 3 und 4 je 1 ccm Nierenaufschwemmung, die 20 Min. auf 70° erhitzt ist,
„ 5 und 6 je 1 ccm NaCl (Kontrollen).

Sämtliche sechs Röhrchen werden mit 1 ccm Organantiserum-Verdünnung 1 : 2 = 400 l. D. beschickt und kommen für 45 Minuten ins 37° Wasserbad. Nach Zentrifugieren wird die überstehende Flüssigkeit geprüft: sämtliche Sedimente haben einen Teil des dargereichten Organantiserums verankert; ein beträchtlicher Teil ist aber noch im Abguß nachweisbar, es hat also Absättigung stattgefunden. Die Sedimente 1—4 werden mit NaCl gewaschen und auf das Volumen von 1 ccm gebracht; auch den Röhrchen 5 und 6 wird so viel Flüssigkeit entnommen, daß sämtliche Röhrchen je 1 ccm enthalten. Nun werden die Röhrchen 1, 3, 5 während 20 Minuten auf 70° erhitzt. Nach Abkühlung erhalten alle Röhrchen je 1 ccm 5-proz., frisches Hammelblut; dann kommen sie für $1\frac{1}{4}$ Stunde ins 37° Wasserbad, in dem sie häufig geschüttelt werden. Nach dieser Zeit wird allen sechs Röhrchen je 1 ccm 10-proz. Komplement zugesetzt, um feststellen, ob eine Transgression des an die Nierenaufschwemmung gebundenen Organantiserums an das frische Hammelblut stattgefunden hat. (Durch besondere Kontrollen wurde festgestellt, daß weder ein Abguß der frischen noch der erhitzten Nierenaufschwemmung auf das verwendete Hammelblut hämolytisch wirkte.)

Ergebnis: In Röhrchen 6, das nur NaCl, Organantiserum, Hammelblut und Komplement enthielt, ist Hämolyse eingetreten.

In Röhrchen 5 ist die Hämolyse ausgeblieben, ein Beweis dafür, daß die zur Anwendung gebrachte Temperatur das freie Organantiserum unwirksam gemacht hat. Die Nierenaufschwemmung enthaltenden Röhrchen zeigen folgendes Verhalten:

1 (unerhitztes Antigen, abgesättigt, dann erhitzt): keine Transgression.
2 (unerhitztes Antigen, abgesättigt, nicht erhitzt): Transgression.
3 (erhitztes Antigen, abgesättigt, dann erhitzt): keine Transgression.
4 (erhitztes Antigen, abgesättigt, nicht erhitzt): Transgression.

Der Versuch beweist also, daß infolge der 20 Minuten langen Erhitzung auf 70°, die das ungebundene Organantiserum zerstört (Röhrchen 5), auch das an unerhitztes (Röhrchen 1), sowie das an erhitztes (Röhrchen 3) Antigen gebundene Organantiserum nicht mehr an frisch zugefügtes Hammelblut überspringt, während von gleich behandeltem, aber nach der Absättigung nicht erhitztem Antigen eine Transgression stattfindet (Röhrchen 2 und 4). Die Erhitzung des an sein Antigen gebundenen Antikörpers macht die Transgression unmöglich[1]).

Für diese Tatsache kommen vier Erklärungsmöglichkeiten in Betracht:

1) Durch die Erhitzung könnte die Bindung so fest geworden sein, daß keine Absprengung mehr stattfindet.

2) Die Erhitzung führt zur Zerstörung der zytophilen Gruppe des Organantiserums. Das so entstandene „komplementophile Ambozeptoid" ist nicht imstande, die Rezeptoren der roten Blutkörperchen zu besetzen.

3) Die Erhitzung verhindert zwar nicht die Absprengung, sie führt aber zur Zerstörung der komplementophilen Gruppe des Organantiserums. Das so entstandene „zytophile Ambozeptoid" kann zwar noch die Rezeptoren der roten Blutkörperchen besetzen; die Hämolyse kann aber nicht eintreten, da das Ambozeptoid kein Komplement verankern kann.

4) Durch die Erhitzung werden sowohl die zytophile als auch die komplementophile Gruppe des Organantiserums zerstört. —

Die ursprüngliche Fragestellung lautete: Ist der an sein Antigen gebundene Antikörper (im vorliegenden Fall also das Organantiserum) hitzebeständig?

Wenn sich nachweisen läßt, daß an irgendeiner Stelle des Antikörpers eine seine Funktion aufhebende Schädigung durch die Erhitzung bewirkt wird, so ist der gebundene Antikörper nicht thermoresistent.

Die oben unter 1) genannte Erklärung für das Ausbleiben

---

1) Aehnliche Versuche mit Uebergang des primär an frisches bezw. erhitztes Hammelblut gebundenen Organantiserums gaben dasselbe Resultat; der Kürze halber wird hier nur ein Versuch mitgeteilt.

der Transgression trifft nicht zu, wie aus der ersten Versuchsanordnung hervorgeht. Dort ist nachgewiesen, daß durch Erhitzen des Antigen-Antikörper-Komplexes die Bindungsfähigkeit des Antigens quantitativ wiederhergestellt wird.

2) Für die Entscheidung der Frage, ob bei der Erhitzung die zytophile Gruppe des Ambozeptors zerstört wird, haben wir eine einwandfreie Versuchsanordnung bisher nicht finden können. Versuche, die wir am freien, nicht gebundenen Antikörper angestellt haben, machen allerdings eine Zerstörung der zytophilen Gruppe durch Erhitzen wahrscheinlich. Immerhin könnten bei der gewählten Versuchsanordnung Aviditätsverhältnisse eine verschleiernde Rolle spielen. Die Frage muß daher vorläufig noch unentschieden bleiben.

Aus dem gleichen Grunde wie 2) muß auch die Frage 4) offen bleiben.

3) Die Versuchsanordnung zur Prüfung, ob beim Erhitzen des gebundenen heterogenetischen Ambozeptors die komplementophile Gruppe zerstört wird, gestaltete sich folgendermaßen:

Versuch III. (23. IX. 20.)

Organantiserum vom 11. VI. 20. Titer am Versuchstage 1:1200.

Röhrchen [1]) 1 und 2 erhalten je 1 ccm 5-proz. Hammelblut, das 3 Minuten im Wasserbad auf 100° erhitzt war. Das Kontrollröhrchen enthält 1 ccm NaCl. Alle 3 Röhrchen werden mit je 1 ccm Organantiserumverdünnung 1:10 = 120 l. D. beschickt. Nach 40 Minuten Wasserbad bei 37° wird zentrifugiert und die Prüfung der Abgüsse vorgenommen. Die Sedimente 1 und 2 haben einen beträchtlichen Teil des vorgelegten Ambozeptors gebunden, wie der Vergleich mit der Kontrolle zeigt. Nach zweimaligem Waschen der Sedimente mit NaCl und Wiederauffüllen auf 1 ccm wird Röhrchen 2 für 3 Minuten auf 100° erhitzt. Ferner werden 2 neue Kontrollröhrchen (3 und 4) angesetzt, so daß jetzt folgende Röhrchen im Versuch sind:

1 erhitztes Hammelblut, abgesättigt, gewaschen,
2 erhitztes Hammelblut, abgesättigt, gewaschen, nochmals erhitzt,
3 erhitztes, sonst unbehandeltes Hammelblut (1 ccm, 5-proz.),
4 1 ccm NaCl.

1) Der Versuch wurde gleichzeitig in dreifacher Ausführung angesetzt; je 3 entsprechend behandelte Röhrchen gaben gleiche Ergebnisse; es wird daher hier nur ein Teil des Versuchs wiedergegeben. Wiederholung des Versuchs an einem anderen Tage gab die gleichen Resultate.

Sämtliche vier Röhrchen, die jetzt je 1 ccm Flüssigkeit enthalten, werden mit je 1 ccm 10-proz. Komplement beschickt und kommen für 30 Minuten ins Wasserbad bei 37°. Dann wird zentrifugiert und jedem Röhrchen 1 ccm Flüssigkeit entnommen. Diese Menge entspricht 0,5 ccm 10-proz. Komplements. Die entnommenen Flüssigkeitsmengen werden mit je 0,5 ccm sensibilisierten Hammelbluts versetzt und 20 Minuten bei 37° im Wasserbad gehalten.

Ergebnis: Abguß von 1: komplette Hemmung; Abgüsse von 2—4: komplette Lösung. Es hat also der in 1 befindliche, an sein Antigen gebundene Ambozeptor das zugesetzte Komplement fixiert. Dagegen ist das Komplement, das zu dem erhitzten Antigen-Antikörper-Komplex (in Röhrchen 2) zugesetzt wurde, nicht verankert worden. Daraus kann man schließen, daß die komplementophile Gruppe des gebundenen Ambozeptors durch die Erhitzung zerstört wurde. Denn wenn sie erhalten geblieben wäre (etwa bei alleiniger Zerstörung der zytophilen Gruppe), so hätte sie als Antikomplement, also komplementbindend wirken müssen. (Vgl. Sachs, Hämolysine des Blutserums, Kolle-Wassermann.) In den Kontrollen 3 und 4 ist das Komplement, wie zu erwarten war, unbeeinflußt geblieben.

Zusammenfassung.

1) Es werden zahlenmäßige Angaben gemacht über die Hitzeempfindlichkeit des heterogenetischen Ambozeptors im freien (ungebundenen) Zustande und über die Thermoresistenz der bindenden Gruppen der Organantigene.

2) Im gebundenen Zustande wird der heterogenetische Ambozeptor in gleicher Weise wie in freiem Zustande durch Erhitzen zerstört.

3) Das wird bewiesen: a) durch die Wiederherstellung der Bindungsfähigkeit des abgesättigen Organantigens infolge Erhitzung, b) durch den Transgressionsversuch, der infolge der Erhitzung negativ ausfällt.

4) Die Wirkung der Erhitzung auf den gebundenen Ambozeptor besteht in einer Zerstörung seiner komplementophilen und wahrscheinlich auch seiner zytophilen Gruppe.

Literatur.

1) Spät, Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 86, 1921, p. 241.
2) Friedberger und Pinczower, ebenda, Orig., Bd. 45, 1908, p. 352.
3) Kumagai, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 14, 1912, p. 269.
4) Bessau, Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 60, 1911, p. 363, und Bd. 83, 1921, p. 344.
5) Weil und Felix, Wiener klin. Wochenschr., 1918; Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 29; Felix und Mitzenmacher, Wiener klin. Wochenschr., 1918.
6) Friedberger und Jerusalem, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 7, 1910, p. 748.
7) Morgenroth, Münch. med. Wochenschr., 1903; Morgenroth und Rosenthal, Bioch. Zeitschr., 1911 und 1912; Philosophow, Bioch. Zeitschr., 1909.

[Aus dem Hygienischen Institut der Deutschen Universität in Prag.]

Ueber die Bildung von X 19-Agglutininen beim Kaninchen nach Infektion mit Kaninchen-Fleckfiebervirus.

Von **E. Weil** und **Th. Gruschka.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 1. Juli 1921.)

Durch den Nachweis des konstanten Auftretens von spezifischen X 19 Agglutininen bei fleckfieberinfizierten Kaninchen (Weil und Felix) fand die Ansicht jener Autoren eine Widerlegung, welche aus dem Fehlen der Agglutination beim fleckfieberinfizierten Meerschweinchen den sicheren Schluß gezogen hatten, daß die Fleckfieberagglutination des Menschen nicht vom Fleckfiebererreger verursacht sei. Durch die bedeutungsvolle Feststellung von Friedberger und Schiff, daß mit Fleckfiebervirus infizierte Meerschweinchen gegen eine virulente Kultur von X 19 geschützt sind, war erwiesen, daß auch dieses Tier spezifische Stoffe gegen X 19 erzeugt, die nicht als Agglutinine, sondern als Schutzstoffe, wahrscheinlich als Bakteriolysine in Erscheinung treten und dem Meerschweinchen eine aktive Immunität verleihen. Aus den Versuchen von Weil und Felix war in Uebereinstimmung mit denen von Doerr und Pick hervorgegangen, daß Kaninchen nicht die außerordentlich hohe Empfindlichkeit gegen das Fleck-

fiebervirus aufweisen wie Meerschweinchen, und es war von Interesse, festzustellen, in welchem Maße Kaninchen, die mit Kaninchenvirus infiziert wurden, sich hinsichtlich der Agglutininbildung verhalten. Daß das Fleckfiebervirus sich von Kaninchen auf Kaninchen weiter übertragen läßt, wurde bereits in einem Versuche von Doerr und Pick gezeigt. Während Weil und Felix eine erfolgreiche Infektion des Kaninchens durch das Auftreten der Agglutinine in 100 Proz. (bis jetzt über 80 Kaninchen) erzielt hatten, wenn die Infektion mit einer größeren Virusmenge vorgenommen wurde, hatten Doerr und Pick nach Uebertragung von Meerschweinchenvirus 4mal bei 9 Kaninchen ein negatives Resultat, wenn sie die Rückübertragung auf das Meerschweinchen vornahmen. Dies würde beweisen, daß die Vermehrung des Virus bei Kaninchen nur in geringem Maße erfolgt, so daß dieselbe zwar zur Agglutininbildung, nicht aber zur Weiterübertragung auf das Meerschweinchen ausreicht. Allerdings müßte dabei dem geeigneten Zeitpunkt der Uebertragung Rechnung getragen werden. Dieser Umstand stellte jedoch für die erfolgreiche Ausführung unserer jetzigen Versuche das wichtigste Moment dar, und wir nahmen an, daß entsprechend den Infektionsverhältnissen des Meerschweinchens am 10. Tage nach der Infektion auch beim Kaninchen eine reichliche Virusmenge in den Organen vorhanden sei.

Wir geben in der beifolgenden Tabelle alle unsere Versuche wieder, die wir angestellt haben, um die agglutinogene Fähigkeit des Kaninchenvirus bei Uebertragung auf Kaninchen zu prüfen.

Wir entnehmen dieser Tabelle, daß, von einer einzigen Ausnahme abgesehen, bei allen Kaninchen die Infektion von Erfolg, d. h. von Agglutininbildung begleitet war. Auffallend aber ist der Umstand, daß die Agglutinine quantitativ in geringerer Menge aufgetreten sind als bei unseren früheren, mit Meerschweinchengehirn infizierten Kaninchen. Bevor wir diese Tatsache einer Besprechung unterziehen, wollen wir auf die Beurteilung der Agglutinationsresultate, wie wir sie üben, etwas näher eingehen.

Wie wir bereits früher hervorgehoben haben, verwenden wir neben der H-Form stets die reine O-Form des X 19, weil

Tabelle I.

Die hier wiedergegebenen Agglutinationsresultate sind nach 18 Std. notiert und beziehen sich auf OX 19.

Kan. No.		Serum-Verd.	Blutentnahmen I. 13. VIII.	II. 10. IX.	III. 17. IX.	IV. 20. IX.		23. X.	29. X.
107	Infiziert mit $^1/_3$ Kaninchen-Gehirn 9 Tage nach der Infektion mit 0,7 Meerschweinchen-Gehirn am 2. IX.	1 : 5	—	—	+++	+++	Nachinfiziert am 16. X. mit $^2/_{10}$ Meerschweinchen-Gehirn	—	—
		1 : 10	—	—	+++	+++		—	—
		1 : 20	—	—	++	++		—	—
		1 : 50	.	.	+	±		.	.
109		1 : 5	—	—	+++	+++		—	—
		1 : 10	—	—	++	++		—	—
		1 : 20	—	—	—	—		—	—
			13. VIII.	27. IX.	4. X.				
111	Infiziert mit $^1/_3$ Gehirn eines Kaninchens 10 Tage nach der Infektion am 20. IX.	1 : 5	—	—	+++	.		.	.
		1 : 10	—	—	+++	.		.	.
		1 : 20	—	—	+	.		.	.
112		1 : 5	—	—	—	.	Nachinfiz. gleichzeitig mit Kan. 107 und 109	+++	+++
		1 : 10	—	—	—	.		+++	+++
		1 : 20	—	—	—	.		++	+++
		1 : 50	.	.	.	.		—	++
		1 : 100	.	.	.	.		—	+
			23. X.	1. XI.	8. XI.			19. XI.	26. XI.
119	Infiziert mit je $^1/_3$ Gehirn von 2 Kaninchen 9 Tage nach der Infektion mit je $^1/_2$ Meerschweinchen-Gehirn am 25. X.	1 : 5	—	—	+++	.		.	.
		1 : 10	—	—	+++	.		.	.
		1 : 20	—	—	+++	.		.	.
		1 : 50	.	.	+	.		.	.
120		1 : 5	—	—	+++	.	Nachinf. m. $^6/_{10}$ Mschw.-Gehirn	+++	+++
		1 : 10	—	—	+++	.		+++	+++
		1 : 20	—	—	+	.		+++	++
								++	—
121		1 : 5	++	+++	+++	.		.	.
		1 : 10	+	+	+++	.		.	.
		1 : 20	—	—	+++	.		.	.
		1 : 50	.	.	+++	.		.	.
		1 : 100	.	.	+++	.		.	.
		1 : 200	.	.	++	.		.	.
		1 : 500	.	.	+	.		.	.
122		1 : 5	—	—	++	.	Nachinf. gleichzeit. m. K. 120	+++	++
		1 : 10			+	.		++	—
123		1 : 5	—	+++	+++	.		.	.
		1 : 10	—	+	+++	.		.	.
		1 : 20	—	—	+++	.		.	.
		1 : 50	.	.	++	.		.	.
		1 : 100	.	.	+	.		.	.
124		1 : 5	—	+	+++	.		.	.
		1 : 10	—	+	+++	.		.	.
		1 : 20	—	—	+++	.		.	.
		1 : 50	.	.	+++	.		.	.
		1 : 100	.	.	++	.		.	.

dieselbe stets gleichmäßige Resultate ergibt und den Nährbodenschwankungen nicht unterworfen ist. Da die Emulsionen der X-Stämme sehr stabil sind und selbst nach 24 Stunden in den Kontrollen keine Bodensatzbildung auftritt, so kann man noch zu dieser Zeit den geringsten Grad der Agglutination scharf erkennen. Um den genauen Endtiter der Fleckfieberagglutination zu bestimmen, ist es auch, worauf wir immer hingewiesen haben, nötig, diesen Zeitpunkt einzuhalten, da die kleinflockige Agglutination, insbesondere in den Grenzdosen sehr spät eintritt, und die kleinen Flocken sich viel weniger rasch zu Boden setzen als z. B. die groben Flocken der Typhusagglutination. Demnach wird eine nur auf 2 bis 4 Stunden ausgedehnte Beobachtung hinsichtlich des Endtiters der Agglutination ein ganz unrichtiges Resultat ergeben. Die Stärke der Agglutination wurde in unseren Versuchsprotokollen in der üblichen Weise +++, ++ und + bezeichnet. Da wir aus Erfahrung wissen, daß viele Autoren den unvollständigen und schwachen Reaktionen, die nach längerer Zeit in Erscheinung treten, keine wesentliche Bedeutung beilegen, so wollen wir, um eine Uebereinstimmung mit diesen zu erzielen, bei der jetzigen Zusammenstellung unserer Resultate nur die nach 18 bis 24 Stunden als +++ bezeichneten Resultate (Bodensatz mit klarer oder fast klarer überstehender Flüssigkeit) berücksichtigen und von diesem Gesichtspunkte aus die früheren Resultate von Weil und Felix mit unseren jetzigen hinsichtlich der Titerhöhe vergleichen. Aus den Untersuchungen von Weil und Felix geht nun hervor, daß von 62 positiven Kaninchen 29 eine komplette Reaktion bis 1 : 50, 12 eine solche bis 1 : 100, 15 bis 1 : 200 und 6 bis 1 : 500 und darüber geben. (In den kurzen Mitteilungen in der Wiener klin. Wochenschrift sind die Endtiter ++ und + wiedergegeben, so daß dort die Agglutinationswerte höher erscheinen.) Wenn wir nun die jetzt erzielten Titerwerte, die nach Infektion mit dem Kaninchengehirn auftraten, mit den früheren vergleichen, so weisen von den 9 positiven Seren 8 eine komplette Reaktion bis höchstens 1 : 50 auf und eines einen Titer von 1 : 100. (Die Endtiter sind aus der Tabelle zu ersehen.) Hinsichtlich der Beurteilung der positiven Reaktionen bei niedrigem Titer sei nochmals darauf hingewiesen, daß eine komplett positive

Reaktion bei 1:5, wenn sie im Verlaufe der Infektion auftritt, eine spezifische Bedeutung besitzt. Man kann sich in diesen Fällen durch Nachinfektion überzeugen, daß eine Titersteigerung nicht mehr zu konstatieren ist. Wir sehen dies bei Kaninchen 109 und 122. Die scheinbare Titersteigerung bei Kaninchen 120 ist nicht auf die Neuinfektion mit dem Meerschweinchengehirn, sondern darauf zurückzuführen, daß bei der 3. Blutentnahme der Höchsttiter noch nicht erreicht war. Denn gerade zu dem Zeitpunkt, bei welchem die Nachinfektion den Höchsttiter hätte zeigen müssen, ist bereits ein Rückgang der Agglutinine zu bemerken. Daß das Fehlen der Agglutinine bei Kaninchen 112 auf das Nichthaften der Infektion zurückzuführen ist, beweist das prompte Auftreten der Agglutinine durch die neuerliche Infektion mit infiziertem Meerschweinchengehirn. Es geht also aus diesen Versuchen hervor, daß das Kaninchengehirn X 19-Agglutinine in geringerer Quantität erzeugt als das Gehirn fleckfieberinfizierter Meerschweinchen.

Es wäre aber hinsichtlich unserer jetzigen Versuche, die zu einem ganz anderen Zeitpunkt angestellt wurden als die früheren, der Einwand möglich, daß das Virus sich geändert hätte und jetzt überhaupt niedrigere Agglutininwerte erzeugt. Wir haben aus diesem Grunde 12 Kaninchen in 3 Serien mit Meerschweinchengehirn infiziert und dabei folgende Resultate erzielt: bis 1:50 reagierten komplett positiv 5, bis 1:100 6 und bei 1:200 1 Kaninchen. Die Endtiter betrugen: bis 1:50 3, 1:100 2, 1:200 6 und 1:500 1 Kaninchen. Daraus ist zu entnehmen, daß auch in dieser Versuchsreihe, die mit den Feststellungen von Weil und Felix übereinstimmt, das Meerschweinchengehirn bei Kaninchen höhere Agglutinationstiter erzeugt als das Gehirn der infizierten Kaninchen.

Was die Höhe des Agglutinationstiters bei fleckfieberinfizierten Kaninchen überhaupt betrifft, so sind Werte, worauf bereits Weil und Felix hingewiesen haben, von 1:200 oder 500 als niedrig zu bezeichnen, wenn man sie mit den Titern vergleicht, die man erzielt, wenn man Kaninchen mit X 19 vorbehandelt. Titerhöhen von 1:2000 bis 10000 und darüber gehören zur Regel. Es muß dabei allerdings in Betracht gezogen werden, daß die Vorbehandlung solcher Kaninchen

mehrmals mit großen Mengen Kulturmaterial vorgenommen wird. Aber um die Fleckfieberinfektion und die künstliche Immunisierung mit X 19 hinsichtlich der Agglutininbildung zu vergleichen, müßte man, bei Voraussetzung der Identität des Agglutinogens des Fleckfiebererregers mit den O-Rezeptoren des X 19, leztere quantitativ in ähnlicher Weise den Tieren einverleiben wie das Fleckfiebervirus. Dies stößt jedoch auf Schwierigkeiten, da wir einerseits keine Kenntnis darüber haben, in welcher Menge sich das Virus im Gehirne der infizierten Tiere findet, insbesondere deshalb, weil wir nicht wissen, ob für den Fleckfiebererreger die Einkeiminfektion gilt, und da uns andererseits jede Kenntnis fehlt, in welcher Weise das Agglutinogen des Fleckfiebererregers wirksam ist. Trotzdem schien es uns angezeigt, mit quantitativ abgestuften Dosen von O X 19 Kaninchen und Meerschweinchen zu infizieren, um vergleichsweise die Intensität der Agglutininbildung bei diesen beiden Tierarten festzustellen. Wir haben die intraperitoneale Infektion gewählt und Kaninchen und Meerschweinchen mit ca. $^1/_{2000}$, $^1/_{200}$ und $^1/_{20}$ Oese lebender Kultur von O X 19 behandelt. Die geringste Dosis betrug ungefähr 300000 Keime. Eine und 2 Wochen nach der Infektion wurde das Blut auf den Agglutiningehalt geprüft.

Das Resultat, das diese Versuche ergeben haben, ist vollkommen eindeutig. Weder Meerschweinchen noch Kaninchen reagieren mit Agglutininbildung auf die Injektion von $^1/_{2000}$ Oese. Die zehnfach größere Menge erzeugt bei 3 von 4 Kaninchen bereits Agglutinine, und zwar bei 3 Tieren bis 1 : 100 und bei einem 1 : 200. Bei Meerschweinchen ist vielleicht bei einem Tiere eine geringgradige Agglutination aufgetreten, was jedoch nicht sicher ist, da bei Meerschweinchen im Gegensatz zu Kaninchen öfters eine Reaktion von 1 : 20 normalerweise zu konstatieren ist. Die 4 übrigen Tiere verhielten sich aber negativ. Erst bei der Dosis von $^1/_{20}$ Oese lassen sich sowohl beim Kaninchen als auch beim Meerschweinchen Agglutinine nachweisen, und zwar geben 2 Kaninchen einen Titer von 1 : 500, eines 1 : 200 und eines 1 : 100. Bei einem fehlt die Agglutination. Die Meerschweinchen reagieren in der Weise, daß eines 1 : 200, 2 1 : 100, eines 1 : 50 und eines 1 : 20 agglutiniert.

Tabelle II.

Die Agglutinationen sind mit OX 19 angestellt und nach 18 Std. notiert.

	Infiziert mit $^1/_{2000}$ Oese OX 19 intraperitoneal am 24. III.				Infiziert m. $^1/_{200}$ Oese OX 19 intraperitoneal am 24. III.			Infiziert mit $^1/_{20}$ Oese OX 19 intraperitoneal am 24. III.		
	No.	Serum-Verdünn.	1. IV.	7. IV.	No.	1. IV.	7. IV.	No.	1. IV.	7. IV.
Meerschweinchen	1	1:20	—	—	6	+++	+++	11	+++	+++
		1:50	—	—		±	±		+++	+++
		1:100	.	.		—	—		++±	++
		1:200	.	.		.	.		±	—
	2	1:20	—	—	7	+	++	12	++±	++±
		1:50	—	—		—	—		+	±
	3	1:20	+	+	8	+	++	13	+++	+++
		1:50	—	—		—	—		++	++
		1:100	.	.		.	.		±	—
	4	1:20	—	—	9	—	—	14	+++	+++
		1:50	—	—		—	—		+++	++
		1:100	.	.		.	.		++	—
	5	1:20	++	++	10	+	+	15	+++	+++
		1:50	—	—		—	—		+++	+++
		1:100	.	.		.	.		++±	+++
		1:200	.	.		.	.		++	++
		1:500	.	.		.	.		—	—
Kaninchen	I	1:20	—	—	VI	—	—	XI	—	—
		1:50	—	—		—	—		—	—
	II	1:20	—	—	VII	+++	+++	XII	+++	+++
		1:50	—	—		++±	++±		+++	+++
		1:100	.	.		+	±		+++	+++
		1:200	.	.		—	—		+++	+++
		1:500	.	.		.	.		+++	++
		1:1000	.	.		.	.		+	—
	III	1:20	—	—	VIII	+++	+++	XIII	+++	+++
		1:50	—	—		++±	+		+++	+++
		1:100	.	.		+±	—		++	+
	IV	1:20	—	—	IX	+++	+++	XIV	+++	+++
		1:50	—	—		+++	+++		+++	+++
		1:100	.	.		++±	++		+++	+++
		1:200	.	.		+	—		+++	+
		1:500	.	.		.	.		++	—
	V	1:20	—	—	X	+++	+++	XV	+++	+++
		1:50	—	—		++±	++		+++	+++
		1:100	.	.		+	—		+++	+++
		1:200	.	.		.	.		+++	+++
		1:500	.	.		.	.		++±	+
		1:1000	.	.		.	.		+	—

Wir können dieser Versuchsreihe mit Sicherheit die beiden Tatsachen entnehmen, daß die Antigenmenge von großem Ein-

fluß auf die Quantität der gebildeten Agglutinine ist, und daß das Kaninchen leichter und intensiver Agglutinine erzeugt als das Meerschweinchen. Diese beiden Umstände sind aber für die vorliegende Frage von ausschlaggebender Bedeutung, weil sie uns gestatten, eine Parallele zu ziehen hinsichtlich der Infektion des Kaninchens und Meerschweinchens mit Fleckfiebervirus und der damit im Zusammenhang stehenden Agglutininbildung gegen X 19. Allerdings scheinen unsere Versuche bezüglich des eben erwähnten ersten Punktes in einem Widerspruch zu stehen mit den bekannten Versuchen von Friedberger, welcher festgestellt hat, daß bereits die einmalige Injektion einer sehr geringen Antigenmenge genügt, um große Mengen von Antikörpern zu erzeugen. Doch beziehen sich diese Angaben einerseits auf gut wirksame Antigene, andererseits auf Bakteriolysine. Es geht aber auch aus diesen Versuchen ganz klar hervor, daß bei der Anwendung der geringen Antigenmengen die Agglutinintiter recht niedrige sind, und die Menge des Antigens selbst für die Erzeugung der Bakteriolysine eine wesentliche Rolle spielt (worauf auch die Autoren hinweisen), wenn wenig wirksame Antigene zur Injektion gelangen.

Wenn es nun gestattet ist, das Agglutinin des Fleckfiebererregers mit den O-Rezeptoren des X 19 zu identifizieren, so fänden wir hinsichtlich der Agglutininbildung durch den Fleckfiebererreger und den X 19 eine befriedigende Erklärung, wenn man annimmt, daß der Fleckfiebererreger im Organismus des Meerschweinchens und Kaninchens nur in geringer Menge vorhanden ist, ungefähr der von uns gewählten Infektionsmenge von $^{1}/_{200}$ Oese entsprechend, oder wenn das Agglutinogen des Fleckfiebererregers schlecht wirksam ist. Durch beide Annahmen würden einerseits die differente Agglutininbildung des Kaninchens und Meerschweinchens verständlich erscheinen und andererseits die verhältnismäßig niedrigen Agglutininwerte des Kaninchens erklärlich sein.

Wir haben auch einen Anhaltspunkt zum Verständnis der Tatsache, warum Kaninchen, die mit Kaninchenvirus infiziert wurden, niedrigere Agglutinationstiter aufweisen als solche, denen Meerschweinchengehirn injiziert wurde. Denn durch unsere Feststellung, daß die Agglutinationshöhe von der Antigen-

menge abhängig ist, würde die Annahme gerechtfertigt erscheinen, daß im Kaninchengehirn wesentlich geringere Mengen des Fleckfiebererregers vorhanden sind als beim Meerschweinchen, so daß bei der Uebertragung des ersteren auf Kaninchen die Vermehrung nicht in dem Maße erfolgt, als bei Infektion mit den größeren Infektionsdosen des Gehirns fleckfieberinfizierter Meerschweinchen; vielleicht findet sich aber auch in den letzteren das virulentere Virus.

Wir haben mit dem Gehirn sämtlicher infizierter Kaninchen gleichzeitig auch Meerschweinchen infiziert und konnten ausnahmslos die Beobachtung machen, daß die Inkubation gegenüber der Infektion mit der gleichen Menge Meerschweinchengehirn um 3—4 Tage hinausgeschoben war. Wir deuten diese Befunde, was bereits in der Arbeit von Weil und Felix ausgesprochen wurde, in der Weise, daß das Virus beim Kaninchen in geringerer Menge vorhanden ist als beim Meerschweinchen und die Inkubationsdauer von der Virusmenge abhängig ist. Inkubationen von 4, ja sogar 3 Tagen, wie sie Doerr und Pick bei den analogen Versuchen beschreiben, haben wir niemals beobachtet und halten sie auch für unwahrscheinlich.

Zusammenfassung.

Das Gehirn fleckfieberinfizierter Kaninchen erzeugt bei Kaninchen Agglutinine gegen X 19. Die Titerhöhe ist geringer als nach Infektion mit dem Gehirn infizierter Meerschweinchen.

Die Höhe der Agglutination ist abhängig von der Antigenmenge und von der Tierart, die zur Antikörpererzeugung benutzt wird. In Experimenten mit Kaninchen und Meerschweinchen wird der Nachweis hierfür erbracht.

Literatur.

Doerr und Pick, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 80, Heft 2.
Friedberger und Moreschi, Zentralbl. f. Bakt., Bd. 39.
Weil und Felix, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 31, Heft 6.

[Aus dem Institut für Pathologische Biologie, Hamburg
(Prof. H. Much).]

Die Beziehung des lipoidartigen Hämolysinogens von Bang und Forssman zu den heterogenetischen Hammelbluthämolysinen.

Beiträge zur Kenntnis der Antigennatur von Lipoiden.

Von Dr. **Hans Schmidt,**
Assistent des Instituts.

(Eingegangen bei der Redaktion am 4. Juli 1921.)

Ohne auf die umfangreiche Literatur über die sogenannten heterogenetischen Hammelblutantikörper, die ich in einer früheren Arbeit, soweit es der Zusammenhang erfordert, erwähnt habe, näher einzugehen, möchte ich in aller Kürze den gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse darüber zusammenfassen, um dadurch besser das Verständnis des Folgenden zu vermitteln.

Die Einspritzung von roten Hammelblutzellen löst beim Kaninchen die Bildung von Antikörpern aus, die nicht nur Hammelblutzellen und die nahe verwandten Ziegenblutzellen, sondern auch Rinderblutzellen zu lösen imstande sind. Solche Antikörper, die also durch Hammelblutzellen erzeugt und gegen diese gerichtet sind, bezeichnet man als „isogenetische". Die isogenetischen Hammelblutantikörper werden durch Hammelblutzellen vollständig, durch Rinder- und Ziegenblutzellen aber nur teilweise im Versuchsröhrchen gebunden. Es lassen sich aber auch durch Einspritzungen von Zellaufschwemmungen aus Organen von Meerschweinchen, Hund, Katze, Pferd, Huhn, Schildkröte usw. bei Kaninchen hammelblutlösende Antikörper erzeugen, die man zum Unterschied von den isogenetischen „heterogenetische" nennt. Diese Antikörper vermögen nicht Rinderblutzellen zu lösen, können aber andererseits außer durch Hammelblutzellen auch durch die zu ihrer Herstellung

benutzten Organzellen gebunden werden, was bei den isogenetischen nicht der Fall ist. Die Hammelblutzellen besitzen zwei Antigene; das eine löst die Bildung der isogenetischen Antikörper aus, während das andere in den Blutzellen nur in kleinerer Menge vorhanden ist, jedoch hitzebeständig ist und also durch Kochen der Blutzellen rein erhalten werden kann. Dieses kochbeständige Antigen der roten Blutzellen kommt gleichfalls in den Organen der oben genannten Tiere vor und wird, da es die heterogenetischen Antikörper erzeugt, als heterophiles Antigen bezeichnet. Es ist in den Organen von Mensch, Hammel, Kaninchen, Ratte, Rind, Schwein, Taube, Gans, Frosch usw. nicht enthalten. Die erste Gruppe wird Meerschweinchengruppe, die zweite Kaninchengruppe bezeichnet. Fast alle Organe der Tiere der Meerschweinchengruppe enthalten das heterophile Antigen, besonders Lunge, Nieren, Herz, Skelettmuskel usw.; in geringerem Grade kommt es in der Leber vor, nicht dagegen im Blut und Fettgewebe. Aus den Organzellen läßt sich das heterophile Antigen mit Alkohol ausziehen, denn diese alkoholischen Auszüge geben mit Hammelblut-Kaninchen-Immunsera eine spezifische Flockung, und zwar beruht diese Flockung auf dem Vorhandensein der heterogenetischen Antikörper. In einem hammelblutlösenden isogenetischen Serum, das man z. B. durch Vorbehandlung von Meerschweinchen mit Hammelblutzellen gewinnen kann, fehlt der heterogenetische Anteil der Antikörper; solches Serum löst zwar Hammelblutzellen, wird aber durch den erwähnten alkoholischen Auszug nicht ausgeflockt.

Das Zustandekommen der Flockung ist von der Anwesenheit lipoider Stoffe abhängig. Es war demnach im Hinblick auf die Abgestimmtheit der Flockung anzunehmen, daß das heterophile Antigen als ein lipoider Stoff in der alkoholischen Lösung ist.

Nun war er bekanntlich Bang und Forssman gelungen, aus Rinderblutzellen einen lipoidartigen Stoff zu erhalten, der bei Kaninchen hochwertige Rinderbluthämolysine zu erzeugen vermochte. War es bei gleicher Versuchsanordnung möglich, auch aus Hammelblutzellen einen solchen lysinogenen Stoff zu erhalten, so lag es nahe, anzunehmen, daß das nach Bang und Forssman erhaltene Antigen den hetero-

philen Antigenteil der Blutzelle darstellt, der ja nach allem, was wir wissen, gleichfalls lipoider Natur sein dürfte. Bei dieser Annahme wäre demnach zu erwarten, daß die mit dem lipoiden Antigen aus Hammelblutzellen bei Kaninchen hergestellten Immunsera dem reinen heterogenetischen Typus entsprechen. Ein gleiches Serum müßte sich auch mit den Lipoiden aus den Organen der Tiere der Meerschweinchengruppe herstellen lassen. Dies um so mehr, als die Erzeugung solcher Antikörper durch die Organzellen selbst sich durch die Einspritzung von verhältnismäßig wenig Zellen leicht bewerkstelligen läßt.

Versuche von Amako (3), mit alkoholischen Organauszügen von entbluteten Meerschweinchenorganen bei Kaninchen Hämolysinbildung hervorzurufen, scheiterten. Amako kam zum Schluß, „daß die antikörpererregende Substanz der Organe nicht durch Alkohol extrahierbar ist". Diese Folgerung erwies sich durch den Nachweis der spezifischen Flockung mit solchen alkoholischen Organauszügen als verfrüht. Andererseits war es Thiele und Embleton (4) bei Nachprüfungen der Ergebnisse von Bang und Forssman nicht gelungen, mit den Rückständen von Azeton-, Aether- und Alkoholauszügen aus roten Schafblutzellen bei Kaninchen Hämolysine zu erzeugen. Auch mit den Rückständen von Katzenorganauszügen konnten sie keine Antikörper bei Kaninchen erzeugen; jedoch prüften diese Autoren in letzterem Falle die Hämolyse nur gegen Katzenblutzellen und nicht auch gegen Hammelblutzellen. Die Ergebnisse von Bang und Forssman waren jedoch von Dautwitz und Landsteiner (5) an Pferdeblutzellen, sowie von Takaki (6) an Rinderblutzellen bestätigt worden.

Ich hatte bereits in meiner früheren Arbeit (1) über Immunisierungsversuche berichtet. Es wurden einer Reihe von Kaninchen Rückstände der Aether- und Alkoholauszüge aus getrockneten Organen von Meerschweinchen, Hunden und Katzen eingespritzt. Jedoch fielen die bereits zweimal intravenös vorbehandelten Tiere einer Stallseuche zum Opfer, so daß der Versuch nicht durchgeführt werden konnte. Immerhin hatte das den toten Tieren entnommene Blut keine Spur hammelblutlösender Fähigkeit.

Ich habe dann in Anbetracht des großen theoretischen Interesses, das diese Untersuchungen für die Frage nach der Antigennatur von Lipoiden haben, sowie um die Richtigkeit der obenerwähnten Annahmen nachzuweisen, die Immunisierungsversuche bei Kaninchen wiederholt.

Vorbehandlung der Tiere.

a) Mit Stoffen aus Organzellen der Meerschweinchengruppe.

Da ich bei Ausflockungsversuchen mit Hundelunge stets sehr gute Ergebnisse hatte, so wurde auch hier Hundelunge gewählt. Eine frische Hundelunge wurde zerkleinert und durch Waschen in Wasser möglichst blutfrei gemacht. Nach Trocknen des Zellbreies wurde im Mörser ein sehr feines Pulver hergestellt, das dann der ausziehenden Wirkung von Aether, Alkohol und Azeton unterworfen wurde. Die Lösungen wurden dann eingedampft, der Rückstand in Alkohol aufgenommen und durch tropfenweisen Zusatz von NaCl-Lösung emulgiert. Aus der Emulsion wurde der Alkohol durch leichtes Erwärmen vertrieben, und mit dieser Emulsion wurde ein Kaninchen, von dessen Serum 0,01 ccm keine Spur Lösung von Hammelblutzellen bewirkte, 5mal in Abständen von je einer Woche durch Einspritzung in die Ohrvene behandelt.

b) Mit Stoffen aus Hammelblut.

Es wurde entsprechend den Vorschriften von Bang und Forssman versucht, das lipoidartige Lysinogen der roten Hammelblutzellen zu erhalten. Hammelblut wurde in Na-Citratlösung aufgefangen, vom Plasma getrennt und mit NaCl-Lösung zweimal gewaschen. Der gewaschene Blutzellenbrei wurde dann mit Aether für mehrere Tage unter öfterem kräftigen Durchschütteln bei Zimmertemperatur ausgezogen. Der klare überstehende Aether wurde abgehebert, filtriert und eingedampft. Der Rückstand wurde mit Azeton behandelt, worin er sich zum größten Teile löste. Die Lösung wurde von dem Rückstand getrennt und eingedampft. Der azetonlösliche Rückstand ließ sich in Alkohol restlos aufnehmen, und diese alkoholische Lösung wurde mit Kochsalzlösung

emulgiert und nach Vertreiben des Alkohols durch Erwärmen intravenös Kaninchen eingespritzt (Kaninchen I).

Der azetonunlösliche Teil wurde mehrere Male mit Azeton gewaschen und schließlich zur Trockne eingedampft. Es blieb eine in Anbetracht des einen Liter betragenden Blutzellenbreies, von dem ausgegangen war, sehr geringe Menge einer bräunlichen, fettartigen Masse zurück. Diese wurde im Achatmörser unter tropfenweisem Zusatz von NaCl zu einer feinen Emulsion zerrieben und intravenös Kaninchen einverleibt (Kaninchen II).

Ein Teil der Blutzellen wurde durch mehrmaliges Waschen mit Alkohol vom Wasser befreit, getrocknet und im Mörser auf das feinste zerrieben. Der braune Staub wurde dann gründlichst mit fettausziehenden Mitteln behandelt, mehrere Male mit kochendem Aether und kochendem Azeton, schließlich noch einige Male mit Chloroform. Dann wurde wieder getrocknet, und das Trockenpulver im Achatmörser mit NaCl-Lösung zu einer feinen Suspension zerrieben, die Kaninchen intraperitoneal einverleibt wurde (Kaninchen III).

Ferner wurde das Citratplasma, das nach Abschleudern der roten Zellen und der Leukozyten nur noch wenig trüb aussah und mikroskopisch anscheinend nur Blutplättchen enthielt, sehr scharf zentrifugiert. Der Bodensatz, der in NaCl-Lösung einmal gewaschen wurde, wurde dann in NaCl-Lösung suspendiert und intravenös Kaninchen gegeben (Kaninchen IV).

Für die folgenden Versuche kamen demnach zur Untersuchung:

Kaninchen I: vorbehandelt mit azetonlöslichem Anteil der Fettlipoide von Hammelblutzellen.

Kaninchen II: vorbehandelt mit azetonunlöslichem Anteil der Fettlipoide von Hammelblutzellen.

Kaninchen III: vorbehandelt mit Hammelblutzellen, die von Fetten und Lipoiden tunlichst befreit waren.

Kaninchen IV: vorbehandelt mit Hammelblutplättchen.

Zum Vergleich wurde noch das käufliche Immunserum der Höchster Farbwerke herangezogen, das von Kaninchen nach Vorbehandlung mit unveränderten Hammelblutzellen gewonnen war.

Den Tieren wurden 5mal in Abständen von ca. 8 Tagen Einspritzungen gemacht und in den Zwischenzeiten Blutproben entnommen, mit denen der folgende Versuch im ganzen 4mal angestellt wurde. Die angeführten Versuchsniederschriften stammen von dem vierten Versuch. Die Versuche waren alle im ganzen gleichsinnig; die Verschiedenheiten beruhten auf der wechselnden hämolysierenden Kraft der Sera. Alle Kaninchen waren vorher auf Normalschafbluthämolysine untersucht worden. Es wurden nur solche benutzt, deren Serum bei 0,02 ccm keine Hämolyse zeigte.

Versuche.

Da bei dem mit Hundelungenauszug vorbehandelten Kaninchen das 5 Tage nach der letzten Einspritzung entnommene Blutserum bei 0,01 ccm keine Spur von Hammelblutlösung sowie von einer Ausflockung von alkoholischen Organauszügen der Meerschweinchengruppe bewirkte, so wurden damit keine weiteren Versuche angestellt.

Hämolyse von Hammelblutzellen.

Die Kaninchensera wurden bei 56° für eine halbe Stunde erwärmt. Je 0,6 ccm der Serumverdünnung wurde mit 0,5 ccm einer 5-proz. Hammelblutaufschwemmung versetzt, und nach einer Einwirkung von 10—15 Minuten bei 37° wurden 0,5 ccm 1 : 10 verdünnten Meerschweinchenserums zugesetzt, das in einer Vorprobe keine Spur hammelblutlösende Eigenschaft aufwies.

Ablesung nach Brutschrankaufenthalt von 1 Std.

	Serumverdünnung:					
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
Höchst	—	—	—	—	—	—
Kaninchen I	+	+	+	+	+	+
„ II	—	—	—	—	—	—
„ III	—	±	+	+	+	+
„ IV	—	—	—	—	∓	±

Es bedeuten: komplette Hämolyse —, deutliche Hämolyse ∓, schwache Hämolyse ±, keine Hämolyse +.

Ausflockungsversuch.

Eine Hundelunge war nach Zerkleinern mit Wasser gewaschen worden, um sie möglichst blutarm zu machen. Dann wurde der Brei auf Glasplatten ausgebreitet und getrocknet. Nach dem völligen Trocknen wurden die harten Massen im Mörser fein zerrieben und zuerst mit Aether ausgezogen, dann, nach Entfernen des Aethers mit Alkohol und schließlich nach Entfernen des Alkohols, nochmals mit 96-proz. Alkohol. Dieser letzte Auszug erwies sich in jeder Hinsicht brauchbar, um die spezifische heterophile Ausflockung nachzuweisen. Er wurde im Verhältnis 1 : 3,5 mit physiologischer NaCl-Lösung tropfenweise verdünnt, und diese Emulsion war deutlich opaleszent. Auf 0,5 ccm dieser Auszugsverdünnung wurden je 0,05 ccm der obigen inaktivierten Sera im Gesamtvolumen 1,0 ccm wirken gelassen. Die Ablesung geschah nach 12-stündigem Stehen bei 37°:

Höchst	I	II	III	IV	Auszugskontrolle ohne Serum
++++	—	++++	—	—	—

Je nach dem Grade der Ausflockung wurden die Bezeichnungen ++++, +++, ++, +, +, — gewählt.

Bindungsversuch.

Zu dem Bindungsversuch wurden je 0,2 ccm des inaktivierten Serums + 0,8 ccm NaCl-Lösung mit je 1 ccm Zellenaufschwemmung versetzt. Als Zellenaufschwemmung wurde einmal eine 50-proz. Aufschwemmung von gewaschenen Hammelblutzellen (a), dann eine dichte Aufschwemmung von gewaschenen Meerschweinchennierenzellen (b) benutzt. Unter häufigem Umschütteln wurden die, je 2 ccm im Gesamtvolumen betragenden Aufschwemmungen für eine Stunde bei 37° belassen und dann sehr scharf zentrifugiert. Zur Kontrolle standen je 0,2 ccm Serum in 2 ccm Volumen NaCl-Lösung die gleiche Zeit über bei 37° (c). 0,1 ccm der klaren überstehenden Flüssigkeit gab dann, mit 0,9 ccm NaCl-Lösung versetzt eine Verdünnung von 1 : 100.

Hämolyse nach der Bindung.

Technik wie oben. Ablesung nach einer Stunde Brutschrankaufenthalt.

		Verdünnung					
		1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
Höchst	a	±	+	+	+	+	+
	b	—	—	—	—	∓	+
	c	—	—	—	—	—	—
II	a	—	—	—	±	+	+
	b	—	—	—	—	∓	+
	c	—	—	—	—	—	—
III	a	+	+	+	+	+	+
	b	+	+	+	+	+	+
	c	—	±	+	+	+	+
IV	a	∓	±	+	+	+	+
	b	—	—	—	—	±	+
	c	—	—	—	—	±	+

Serum I wurde nicht geprüft, da schon vor der Bindung keine Hämolyse eingetreten war.

Flockungsversuch nach der Bindung.

Unter den gleichen Bedingungen und mit der gleichen Hundelungenauszugsverdünnung wie oben wurde nach der Bindung mit den klar ausgeschleuderten Serumverdünnungen eine Flockung angesetzt. 0,5 ccm der überstehenden Flüssigkeit enthielten 0,05 ccm des ursprünglichen Serums. Die Ablesung geschah nach 12 Stunden Aufenthalt bei 37°.

	Höchst	I	II	III	IV
a) Nach Bindung mit Hammelblutzellen	±	—	—	—	—
b) Nach Bindung mit Nierenzellen	+	—	±	—	—
c) Kontrolle ohne Zellzusatz	++++	—	++++	—	—

Hämolyse nach stattgehabter Bindung und Flockung.

Die Lösungen der letzten Flockungsprobe wurde nochmals auf ihre hämolysierende Fähigkeit geprüft. Technik wie oben. 0,2 ccm der Lösung wurden mit 0,8 ccm NaCl-Lösung versetzt und entsprachen dann einer Verdünnung von 1 : 100. Ablesung nach einer Stunde Brutschrankaufenthalt.

		Verdünnung				
		1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600
Höchst	a	+	+	+	+	+
	b	—	—	∓	+	+
	c	—	—	—	—	+
II	a	—	—	—	+	+
	b	—	—	—	+	+
	c	—	—	—	—	+
III	c	+	+	+	+	+
IV	a	+	+	+	+	+
	b	—	—	—	±	+
	c	—	—	—	±	+

Besprechung der Versuche.

Die Immunisierung der Kaninchen mit den verschiedenen aus Hammelblut hergestellten Stoffen erwies zunächst die Unmöglichkeit, mit dem azetonlöslichen Anteil der roten Blutzellen Hämolysine zu erzeugen. In diesem Anteil sind die Fette, Fettsäuren und eine Reihe von Lipoiden, besonders die Cholesterine enthalten. Diese Fette und Lipoide schalten demnach für die Hämolysinbildung aus. Aus diesem Grunde waren auch die weiter oben und in meiner früheren Arbeit erwähnten Versuche, mit den Fettlipoiden aus Hundelunge ein Schafbluthämolysin zu erzeugen, negativ geblieben. Es waren eben auch dabei die azetonlöslichen Bestandteile der Zellen verwandt worden, wie auch bei den gleichfalls negativ verlaufenen Versuchen von Thiele und Embleton. Diesem negativen Ausfall der Hämolysinbildung entsprach auch der negative Ausfall der Ausflockungsprobe.

Im Gegensatz dazu vermochte die Einspritzung des azetonunlöslichen Teiles des Aetherauszuges aus roten Schafblutzellen eine sehr kräftige Hämolysinbildung hervorzurufen. Der Hämolysintiter des Kaninchen II erwies sich bei Titration zum Endwerte nur wenig niedriger als der des Höchster Immunserums.

Hiermit ist die Richtigkeit der Ergebnisse von Bang und Forssmans Versuchen auch bei Hammelblut erwiesen.

Ist nun dieser azetonunlösliche Teil ein wirkliches Lipoid?

Bang und Forssman betonten zunächst, daß es vorteilhafter sei, von frischen Blutzellen auszugehen, anstatt von

getrockneten, obgleich aus solchen das Lysinogen ebenfalls erhalten werden konnte. Der Einwand, daß der Aether aus frischen Blutzellen neben Wasser auch gelöste Eiweiße aufnehmen kann, besteht zwar zu Recht, aber diese Eiweißspuren für die Lysinogenwirkung verantwortlich zu machen, ist allein schon durch die Möglichkeit, auch mit wasserfreiem Aether aus getrockneten Blutzellen das Lysinogen zu erhalten, nicht statthaft. Durch die weiteren Löslichkeitseigenschaften des Lysinogens wird dieser Einwand völlig entkräftet, selbst wenn man dem die Versuche von Friedberger und Dorner (7) entgegenhält, daß in der Tat äußerst geringe Mengen von roten Blutzellen noch zur Hämolysinbildung befähigt sind. In meinen Versuchen war der Aether nach tagelangem Absitzenlassen der Blutzellen vorsichtig abgehebert worden und dann noch durch 6 Schichten gehärteten Filtrierpapieres No. 605 von Schleicher & Schüll geschickt worden, um auch die letzte Möglichkeit zu nehmen, daß vielleicht einige Stromata in das Filtrat gekommen sein könnten. Dadurch, daß das Lysinogen in dem azetonunlöslichen Teil des Aetherrückstandes angetroffen wurde, war seine Identität mit Fetten, Fettsäuren, sowie den meisten Lipoiden, besonders Cholesterin, ausgeschlossen. Aus dem azetonunlöslichen Teil ließ es sich mit kochendem Benzol in wirksamer Form ausziehen und konnte daher unmöglich ein Eiweißkörper, ein Ferment oder eine fermentähnliche Substanz sein. Da es sich aus der eingetrockneten Benzollösung weder durch heißen noch durch kalten Alkohol ausziehen ließ, konnte es sich auch nicht um eines der bekannten Phosphatide, Cerebroside oder Protagon handeln. Bang und Forssman fanden es in aqua dest. unlöslich, doch hat später Takaki, der mit Pferdeblut arbeitete, zeigen können, daß der lysinogene Stoff unter gewissen Bedingungen in verdünnter NaCl-Lösung in Lösung gebracht werden kann. In dieser Lösung konnte kein Eiweiß nachgewiesen werden, doch gab dieselbe mit Alphanaphthol und Schwefelsäure eine positive Reaktion nach Molisch für Kohlehydrate. Takaki fand ebenfalls, daß das Lysinogen mit keinem bekannten Lipoid identisch sein kann.

Man kann also bis jetzt nur sagen, daß der lysinogene Stoff seinen Lösungsverhältnissen entsprechend lipoider Natur

sein dürfte, jedoch ist seine Einreihung unter die Lipoide vorderhand nur eine vorläufige.

Wenn nun dieser lysinogene Stoff von lipoidartiger Beschaffenheit der einzige ist, der in den roten Blutzellen vorkommt, so wäre zu erwarten, daß die Blutzellen nach Entfernung dieses Stoffes nicht mehr die Fähigkeit zur Hämolysinerzeugung besitzen. Versuche von Dautwitz und Landsteiner mit nach verschiedenen Methoden entfetteten Rinderblutstromata ergaben, daß die entfetteten Stromata noch kräftige Lysinbildung hervorbrachten.

Mein Versuch zeigte, daß Blutzellen, die auf das gründlichste von Fetten und Lipoiden befreit waren, doch noch bei Kaninchen III Hämolysine erzeugten, allerdings in nur spärlichem Mase. Dies könnte einmal daran liegen, daß es sehr schwer ist, den letzten Rest des lysinogenen, lipoidartigen Stoffes aus den Blutzellen zu entfernen, und daß eben dieser Rest für die Lysinbildung verantwortlich zu machen ist. Anderseits ist die lange Einwirkung von organischen Lösungsmitteln bei ihrer Siedetemperatur nicht ohne Belang für die spezifischen Eiweiße der Stromata, so daß diese dadurch beträchtlich von ihrer lysinogenen Fähigkeit verloren haben könnten. Ich möchte mich vorläufig der letzteren Ansicht anschließen, da sie auch besser mit der Annahme von zwei verschiedenen Antigenen in den roten Hammelblutzellen übereinstimmt: einmal das native Hammeleiweiß, das keine stärkere Erhitzung verträgt und dann das heterophile hitzebeständige Antigen, das dem Bestandteil entspricht, den die Hammelblutzellen mit Organzellen der Tiere der Meerschweinchengruppe gemeinsam haben.

Dieses letztere Antigen scheint der spezifischen Flockung aus alkoholischen Lösungen zufolge lipoider Natur zu sein, und die Versuche dieser Arbeiten waren unternommen worden, um zu zeigen, daß das heterophile Antigen in seinen Eigenschaften dem lipoidartigen Lysinogen Bang und Forssman entsprechen könnte.

Nimmt man diese Annahme an, dann müßte sich ergeben, daß das mit dem Bang-Forssmanschen Lipoid hergestellte Hämolysin ein heterogenetisches ist und sich als solches von dem isogenetischen Hämolysin unterscheiden läßt, wie auch

von dem mit entfetteten Blutzellen gewonnenen Hämolysin, das ein rein isogenetisches sein müßte.

Bei der Ausflockung mit einem alkoholischen Auszug aus heterophilem Antigen (Hundelunge) stellte sich nun heraus, daß das Serum von Kaninchen II, das das azetonunlösliche Lipoid erhalten hatte, entsprechend seiner guten hammelblutlösenden Eigenschaft den Hundelungenauszug ebenso vollständig ausflockte wie das Höchster Immunserum. Hingegen gab das Serum von Kaninchen III, das entfettetes Hammelblut enthalten hatte, keine Ausflockung; allerdings auch nur eine wesentlich geringere Hämolyse.

Unterwirft man die Sera der absorbierenden Wirkung von Hammelblutzellen, so weiß man, daß die Blutzellen imstande sind, alle, sowohl die isogenetischen, wie die heterogenetischen Antikörper zu binden, während eine Aufschwemmung von Meerschweinchennierenzellen nur letztere Antikörper bindet. Es müßte demnach durch die Nierenzellenaufschwemmung dem Höchster Serum nur ein Teil, nämlich der heterogenetische Teil der Hämolysine genommen sein, während dem Serum von Kaninchen II dadurch alles Hämolysin genommen wird, und dem Serum von Kaninchen III nichts von seiner hämolytischen Kraft verloren geht. Entsprechend müßte nach der Bindung durch Meerschweinchennierenzellen die Ausflockung ausfallen, insofern Höchster Serum, wie auch Serum II alle ausflockenden Eigenschaften verlieren, da diese ja, wie ich in früherer Arbeit zeigen konnte, nur an den heterogenetischen Serumanteil gebunden zu sein scheinen.

Der Ausfall der Hämolyse sowie der Flockung nach der Bindung zeigte nun bei dem Höchster Serum, wie zu erwarten war, daß Hammelblutzellen sowohl die Hämolyse wie auch die Flockung aufheben und daß Meerschweinchenzellen zwar die Flockung so gut wie beseitigen, die Hämolyse jedoch nur gering beeinflussen.

Das Serum von Kaninchen II verhält sich nun aber nicht ganz der Annahme entsprechend. Die Hämolyse wird durch die Bindung mit beiden Zellarten nur wenig beeinflußt, durch Hammelblutzellen etwas mehr als durch Meerschweinchennierenzellen. Dagegen wird die Ausflockung durch beide Zellarten so gut wie aufgehoben.

Daß demnach der azetonunlösliche Teil der Hammelblutzellen heterophiles Antigen enthielt, geht aus der Tatsache der Flockung vor der Bindung und dem Verschwinden derselben nach der Bindung hervor. Anderseits kann das Kaninchen II auch nicht ein reines heterogenetisches Antiserum geliefert haben, da die Hämolyse nur wenig durch die Bindung beeinträchtigt worden war. Auffallend ist der Unterschied in dem Verhalten der Sera vom Kaninchen II und dem Höchster Serum gegenüber Hammelblutzellen. Die Zellen haben wohl, wie aus dem negativen Ausfall der Flockung folgt, die heterogenetischen Antikörper in beiden Seren gebunden, in dem Höchster Serum auch die isogenetischen, nicht jedoch alle Hämolysine in dem Serum II. Wären die Hämolysine isogenetischer Natur, müßten sie auch gebunden worden sein.

Mithin enthält das Antiserum II wohl heterogenetische Hämolysine, aber auch solche, welche weder diesem noch dem isognetischen Typus entsprechen.

Müssen wir noch einen dritten Typus unterscheiden?

Die durch die entfetteten Hammelblutzellen bei Kaninchen III erzielten Hämolysine wurden von beiden Zellarten vollständig absorbiert. Die Hämolyse war jedoch so schwach, daß der Versuch nicht beweiskräftig ist. Jedoch möchte ich aus dem negativen Ausfall der Ausflockung entnehmen, daß das Kaninchen III keine heterogenetischen Antikörper gebildet hat. Der Flockungsvorgang selbst ist, wie gesagt, nur an die heterogenetischen Antikörper gebunden. Mithin ergibt eine Prüfung der Hämolyse nach der Flockung, daß die lytische Kraft des Höchster Serums kaum abgenommen hat, da dieses Serum ja in der Hauptsache isogenetische Lysine enthält.

Aber das Serum II hat ebenfalls durch die Flockung nicht nennenswert von seiner lytischen Kraft verloren. Hieraus ergibt sich der gleiche Schluß, daß zwar das mit dem azetonunlöslichen Teil gewonnene Serum III heterogenetische, daher flockende, Antikörper enthält, daß jedoch in der Hauptmenge das Lysin ein anderes sein muß. Wäre es isogenetisch, so hätte wie bei Höchst (a) auch bei II (a) nach der Bindung mit Hammelblutzellen keine Hämolyse auftreten dürfen.

Es war von besonderem Interesse, mit diesen Seren das Serum IV zu vergleichen, das durch Einspritzung von Hammel-

blutplättchen gewonnen war. Das Serum IV gab eine kräftige Hämolyse, jedoch keine Spur einer Ausflockung. Man kann aus diesem letzteren Umstand schließen, daß die lytische Kraft nicht auf Antikörpern beruht, die durch Beimengungen von roten Hammelblutzellen hervorgerufen sind, obwohl nach den oben bereits erwähnten Beobachtungen von Friedberger und Dorner sehr wenige Blutzellen zur Immunisierung ausreichen.

Ein mit Meerschweinchenleukozyten beim Kaninchen erzeugtes Hämolysin besitzt im Gegensatz zu den Erythrozyten heterogenetische Antikörper, wie Spät (9) zeigen konnte. Allerdings hat Spät die Blutplättchen nicht berücksichtigt. Beim Hammel scheint das Umgekehrte der Fall zu sein. Die Blutplättchen enthalten kein heterophiles Antigen, wohl aber die Erythrozyten; ob auch die Leukozyten, bliebe noch zu untersuchen. Mit dieser Auffassung harmoniert auch der Bindungs versuch insofern Meerschweinchennierenzellen nicht die geringste absorbierende Fähigkeit auf die Hämolysine aufweisen, dagegen rote Hammelblutzellen die genannten Lysine binden konnten. Wurde das Serum nach der Bindung mit alkoholischem Hundelungenauszug versetzt, so war nach 12 Stunden das Lösungsbild in keiner Weise verändert.

Das Antiblutplättchenserum ist demnach ein streng isogenetisches Serum.

Man könnte einwenden, daß die Bildung der Hämolysine bei Kaninchen IV nur durch die, wenn auch sehr geringe Zahl fast unvermeidbarer Erythrozyten hervorgerufen sei. Daß dabei keine heterogenetische Antikörperbildung nachweisbar war, kann an dem zu geringen Anteil des heterophilen Antigens liegen, das ja an sich schon einen verhältnismäßig geringen Teil der Antigene der roten Blutzellen ausmacht und bei der kleinen Gesamtzahl etwa eingespritzter roter Zellen von unterschwelliger Menge gewesen sein kann. Aus obigen Versuchsergebnissen läßt sich der Einwand nicht widerlegen, doch denke ich später gelegentlich anderer Versuche auf dieses Blutplättchenantiserum zurückzukommen.

Läßt man diesen Einwand bestehen, dann stellt der Versuch eine in Anbetracht der Sorgfalt, die auf die Entfernung der roten Zellen aus der Blutplättchenaufschwemmung auf-

gewandt wurde, beachtenswerte Bestätigung der von Friedberger und Dorner beobachteten Tatsache dar, daß bereits homöopathische Mengen Erythrozyten zur Immunisierung genügen. Andererseits würde der Versuch dann beweisen, daß die Menge des heterophilen Antigens einen gewissen Wert nicht unterschreiten darf, wenn es noch nachweisbar sein soll.

Ich persönlich neige der Ansicht zu, in dem Serum IV ein Hammelblutplättchenantiserum zu erblicken, dessen Antikörper vom isogenetischen Typus sind.

Wir wissen, daß es möglich ist, mit Organzellen von Tieren der Meerschweinchengruppe bei Kaninchen Hammelhämolysine zu gewinnen. Ferner wissen wir, daß es mit Alkohol gelingt, aus diesen Organzellen Auszüge zu erhalten, die eine spezifische Flockung mit heterogenetischen Hammelhämolysinen geben. Es wurde daraus der Schluß gezogen, daß in den alkoholischen Auszügen sich das heterophile Antigen befindet, das sich mit dem Antikörper unter einer Reaktion bindet, die zu einer sichtbaren Ausflockung führt. Ich konnte in einer früheren Arbeit (10) zeigen, daß es möglich ist, durch Aether aus den abgeschleuderten und gereinigten Flocken das gleiche Antigen wieder herauszuziehen, das, nun wieder in Alkohol gelöst und mit NaCl-Lösung emulgiert, mit heterogenetischen Antikörpern wieder unter Flockenbildung reagiert.

Trotzdem nun vieles dafür zu sprechen scheint, daß dieser Aether-Alkoholauszug der Flocken das reine heterophile Antigen enthält, ist es mir jedoch niemals gelungen, durch Behandlung mit Emulsionen dieses Auszuges beim Kaninchen Antikörper zu erhalten, die sowohl Hammelblut lösten, wie auch mit spezifischem Auszug unter Flockenbildung reagierten. Beide Erscheinungen blieben bei dem Versuchstier auch nach mehrmaliger, in Abständen von 5 Tagen wiederholter Einverleibung größerer Mengen aus.

Die bisherigen Beobachtungen scheinen sich zu widersprechen.

Das von Bang und Forssman aus roten Blutzellen (allerdings nicht vom Hammel) gewonnene Lysinogen erwies sich als alkoholunlöslich. Immerhin konnten diese Autoren auch durch Alkohol das Lysinogen teilweise ausziehen, doch erwiesen sich diese Auszüge zur Hämolysinbildung weit weniger

wirksam als der Aetherauszug. Andererseits ist Alkohol das beste Mittel, um gut ausflockende Auszüge aus Organen der Meerschweinchengruppe zu erhalten. Den Rückstand dieser Organauszüge fand Amako zur Hämolysinbildung ungeeignet, und ich fand den Flockenauszug ebenfalls unwirksam.

Daraus wäre zu folgern, daß das Lysinogen von Bang und Forssman ein von dem heterophilen Antigen in dem alkoholischen Auszuge verschiedener Stoff ist. Jedoch haben meine bisherigen Versuche erwiesen, daß Immunisierung mit dem Lysinogen die Bildung heterogenetischer Antikörper zur Folge hat, allerdings in einem so geringen Maße, daß man annehmen mußte, daß dieses Lysinogen zum größten Teil aus einem andersartigen, zur Zeit noch unbestimmbaren Antigen besteht.

Auf der anderen Seite könnte der Mißerfolg der Immunisierung mit den alkoholischen Auszugsrückständen (Amako) oder mit den Flockenauszügen daran liegen, daß den lipoidartigen aktiven Stoffen noch solche Stoffe beigemengt sind, die die Immunisierung durchkreuzen. Diese Annahme ist um so wahrscheinlicher, als Much (10) bei Versuchen, Lipoidantikörper zu erzeugen fand, daß Beimengungen von Eiweißendprodukten, Stoffen, die mit Ninhydrin positiv reagierten, die Immunisierung mit Lipoiden durchkreuzten und die Antikörperbildung unmöglich machten; diese erfolgte erst, als er mit Stoffen arbeitete, die von diesen Beimengungen frei waren.

In dieser Richtung haben sich die weiteren Forschungen nach der Ursache des Mißlingens der Immunisierung mit alkoholischen heterophilen Organauszügen zu bewegen.

Aber noch auch auf eine andere Weise ließe sich der Lösung dieser Frage näher kommen.

Der Lipoidantikörper, der nach Wassermann (11) der Träger der positiven Syphilisreaktion sein soll, soll sich nach ihm in einer nahezu eiweißfreien Lösung befinden. Er ist demnach aller Wahrscheinlichkeit nach selbst kein Eiweißkörper. Bei Untersuchungen des Flockungsvorganges bei der Meinickeschen D.M.-Probe gelang es mir in ähnlicher Weise in einer äußerst eiweißarmen Lösung noch Stoff nachzuweisen, die eine positive D.M.-Probe geben konnten (9). Handelt es sich also auch hier um Lipoidantikörper, so scheinen dieselben

von Eiweiß getrennt vorkommen zu können. Ist nun das heterophile Hammelblutantigen ein Lipoid und somit die damit erzeugten Hämolysine Lipoidantikörper, so dürfen auch diese keine Eiweißkörper sein. In diesem Falle könnte man hoffen, durch Ultrafiltration durch Filter bestimmter Porenweite Lipoidantikörper in den Filtraten vom Eiweiß getrennt zu erhalten. Untersuchungen dieser Art sind zurzeit im Gange.

Zusammenfassung.

Es hat sich also gezeigt, daß das Bang und Forssmansche Lysinogen aus roten Hammelblutzellen kein reines heterophiles Antigen ist. Das damit bei Kaninchen gewonnene Serum enthält zum Teil zwar heterogenetische Lysine, aber die Hauptmenge der Lysine entsprechen auch nicht den isogenetischen, sondern verhalten sich serologisch von beiden verschieden. Andererseits enthält das Serum, das mit entfetteten Blutzellen gewonnen war, keine heterogenetischen Antikörper, wohl aber isogenetische, allerdings in geringer Menge. Das lipoidartige lysinogene Prinzip der roten Hammelblutzellen entspricht demnach nur teilweise dem heterophilen Antigen der Meerschweinchengruppe.

Ferner erwies sich das Serum, das durch Vorbehandlung von Kaninchen mit Hammelblutplättchen gewonnen wurde, als ein rein isogenetisches Hammelblutimmunserum.

Literatur.

1) Schmidt, Brauers Beitr. z. Klinik d. Tuberkul., Bd. 47, 1921, H. 3, p. 443.
2) Bang und Forssman, Beitr. z. chem. Physiol. u. Path., Bd. 8, 1906, p. 238.
3) Amako, Zeitschr. f. Chemotherapie., Orig., Bd. 1, 1913, p. 298.
4) Thiele und Embleton, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 16, 1913, p. 160.
5) Dautwitz und Landsteiner, Beitr. z. chem. Physiol. u. Path., Bd. 9, 1907, p. 431.
6) Takaki, ebenda, Bd. 11, 1908, p. 274.
7) Friedberger und Dorner, Centralbl. f. Bakt., Bd. 38, 1905.
8) Späth, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 21, 1914, p. 565.
9) Schmidt, Med. Klinik, 1921, No. 20.
10) Much, Beitr. z. Klinik d. Infektionskrankh., Bd. 3, 1913, H. 1.
11) Wassermann, Berl. klin. Wochenschr., 1921, No. 9.

[Aus dem Hygienischen Institut der Akademie für praktische Medizin zu Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. Bürgers).]

Beitrag zu den Beziehungen zwischen Organabbauprodukten und Wassermannscher Reaktion.

Von Dr. **W. Bachmann**,
1. Assistent des Instituts.

(Eingegangen bei der Redaktion am 7. Juli 1921.)

Die aufsehenerregenden Mitteilungen Wassermanns (1), die er in einem Vortrag in der Medizinischen Gesellschaft in Berlin am 15. Dezember 1920 über das Wesen der bei seiner Reaktion wirksamen Komponenten machte, haben von anderer Seite (2) eine völlige Ablehnung erfahren, während Much und Schmidt (3) die neue Lehre Wassermanns von seinem Lipoid-Antikörper als einen weiteren Beweis für die Richtigkeit der von Much in die Theorie und Praxis der Tuberkulose-Immunität eingeführten Lipoid- und Fettantikörper ansehen möchten. Der Streit der Meinungen veranlaßt mich, Ergebnisse von Versuchen zu veröffentlichen, die bereits dem Abschluß nahe waren, als die oben zitierten Arbeiten zu meiner Kenntnis kamen, und die eine Nachprüfung der aus dem Muchschen Institut hervorgegangenen Arbeit von Mahlo (4) enthalten, in der dieser Autor das Verhalten syphilitischer Sera bei der WaR. zu den in ihnen nachweisbaren Eiweißabbaustufen in Beziehung setzen möchte. Mahlo zeigt einmal, daß es gelingt, Wassermann-negative Sera im Reagenzglas durch Zusatz von Glykokoll bis zur Verdünnung 1 : 1000000 positiv zu machen; dasselbe gelingt bei Zusatz von Leucin und Tyrosin in Verdünnungen bis zu 1 : 10000, während Dimethylharnstoff nur in Verdünnungen bis zu 1 : 1000 und 1 : 2000 wirksam ist. Eine zweite Versuchsreihe ergab die Tatsache, daß das Serum von Kaninchen, das vorher Wassermann-negativ reagierte, 5 Stunden und 24 Stunden nach der Injektion von

5 ccm einer Tyrosinlösung 1 : 50 intravenös stark positiv wird. Erst nach dem 19. Tage wird die WaR. wieder negativ. Dasselbe gelingt nach Einspritzung von Leucinlösung 1 : 1000 und von Aminosäuren, die aus der Leber eines Kindes gewonnen wurden, nur daß die WaR. bereits nach 24 bis 48 Stunden wieder negativ ausfällt. Parallel mit diesen Blutuntersuchungen wird der Harn der betreffenden Kaninchen auf abiurete Eiweißabbaustufen mit Hilfe der Ninhydrinreaktion untersucht. Es zeigt sich, daß die Ninhydrinreaktion bis 24 Stunden nach der Einspritzung der Aminosäuren positiv wird, während sie nach 48 Stunden wieder negativ geworden ist. Werden nun Kaninchen, deren Serum von vornherein Wassermann-positiv war, intraperitoneal oder intravenös verschiedene Mengen und Verdünnungen von Leucinlösung eingespritzt, so wird der Wassermann nach 48 Stunden etwa negativ, also zu dem Zeitpunkt, bis zu dem die Ninhydrinreaktion des Harns vom gleichen Tier wieder negativ geworden ist; das heißt nach Annahme des Verfassers, daß nach erfolgter Ausscheidung der Aminosäuren durch den Harn die ursprünglich positive Reaktion des Kaninchenserums wieder auftritt. Wir sehen also zweierlei: einmal die Erscheinung, daß negative menschliche Sera durch Zugabe von Aminosäuren im Reagenzglas positiv werden, ebenso wie das Serum entsprechend vorbehandelter Kaninchen; auf der anderen Seite wird ein positives Kaninchenserum unter der Einwirkung der eingespritzten Aminosäuren, solange diese im Organismus nachweisbar sind, negativ. Dies letzte Versuchsergebnis setzt Mahlo in Parallele mit dem Serum eines behandelten Luetikers, dessen Serum beispielsweise nach der Behandlung mit 0,2 Serummenge negativ reagiert, während es in größeren Verdünnungen wie 0,1 oder 0,05 ein positives Resultat ergibt. Er meint, daß ein Plus von Zerfallsprodukten der Spirochaete pallida oder von Organabbauprodukten unter dem Einfluß der Behandlung entsteht, welche ähnlich wie im positiven Serum eines mit Aminosäure vorbehandelten Kaninchens nun eine negative Reaktion hervorrufen. Diese Auffassung, daß Organabbauprodukte von bestimmter Menge im luetischen Serum den positiven Ausfall der WaR. bedingen, führt ihn nun zu seiner dritten Versuchsreihe, die mit Hilfe der Ninhydrinreaktion abiurete Eiweißabbauprodukte im lueti-

schen Serum nachweist. Er vergleicht den Ausfall der Ninhydrinreaktion solcher Sera mit dem Ergebnis der WaR. und kommt zu dem Resultat, daß enteiweißte Sera von Luetikern in 79 Proz. der Fälle eine Uebereinstimmung von positiver Ninhydrinreaktion und positivem Wassermann zeigen. Daß es sich bei den durch die Ninhydrinreaktion im luetischen Serum nachgewiesenen Stoffen um Organabbauprodukte handelt, schließt Mahlo daraus, daß das Auftreten und Verschwinden eines positiven Wassermann bei Scharlachkranken parallel geht mit dem Ausfall der Ninhydrinreaktion. Es kann sich also nach seiner Meinung nicht um Zerfallsprodukte der Spirochaete pallida handeln.

Much und Schmidt (3) haben diese Untersuchungen von neuem bestätigt und dahin erweitert, daß sie Kaninchen mit Tuberkelbazillenlipoidpartigen (MTbF. 1:10000) intravenös behandelten und ebenfalls beobachteten, daß das vorher Wassermann-negative Serum der Kaninchen mit 0,1 ccm Serum nach 4 Stunden positiv, mit 0,05 Serummenge nach 24 Stunden positiv wurde. Im Gegensatz zu Mahlos Resultaten konnten sie im Reagenzglas ein vorher negatives Serum durch Zugabe der entsprechenden Aminosäureverdünnungen nicht positiv machen. Much und Schmidt schließen aus ihren Versuchen, daß sowohl eine reine Aminosäure als auch ein reines Lipoid die vorher negative Reaktion im Körper positiv zu machen imstande sind und daß eine mittelbare Wirkung über den Weg der Körperzellen anzunehmen ist, da eine entsprechende Beeinflussung von Serum durch Aminosäuren im Reagenzglas ausbleibt. Vor der kritischen Besprechung der Mahloschen und Much-Schmidtschen Versuchsergebnisse möchte ich die Resultate meiner eigenen Untersuchungen anführen.

I.

Als erste Versuchsreihe prüfte ich den Einfluß von Glykokoll, Tyrosin, Leucin und Dimethylharnstoff auf Wassermann-negative menschliche inaktive Sera im Reagenzglas.

Ein Vorversuch, in dem 11 negativen Seren je 0,1 ccm einer Glykokollösung von 1:10 bis 1:1000000 zugegeben wurde, ergab bei 3 Seren eine Spur minimaler Hemmung bis zur Verdünnung 1:1000000, während bei 4 Seren eine starke

Hemmung nur bei Zugabe der Glykokollverdünnung 1 : 10 eintrat. Die übrigen Sera blieben negativ. Es wurde mit der doppelten Komplementeinheit und der vierfachen Ambozeptoreinheit gearbeitet (s. Tabelle I).

Tabelle I.

Serum No.	Glykokoll 1 : 10	1 : 100	1 : 1000	1 : 10000	1 : 100000	1 : 1000000	Kontrolle ohne Glykokoll	Komplementmenge	Ambozeptor:
1 v. 21. III.	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	—	2-fache Komplementeinheit	4-fache Ambozeptoreinheit
2 " "	—	—	—	—	—	—	—		
3 " "	—	—	—	—	—	—	—		
4 " "	—	—	—	—	—	—	—		
5 " "	±	±	±	±	±	±	—		
6 " "	—	—	—	—	—	—	—		
7 " "	—	—	—	—	—	—	—		
8 " "	—	—	—	—	—	—	—		
9 " "	+++	—	—	—	—	—	—		
10 " "	+++	—	—	—	—	—	—		
11 " "	+++	—	—	—	—	—	—		
12 " "	+++	±	±	±	±	±	—		

Da anzunehmen war, daß negative Resultate durch zu hohen Komplementüberschuß vorgetäuscht worden waren, wurde mit Komplementabstufungen gearbeitet, weiterhin wurde eine

Tabelle II.

Serum	Glykokoll 1 : 10	1 : 100	1 : 1000	1 : 10000	1 : 100000	1 : 1000000	Kontrollen ohne Säure und Antigen	Kontrollen ohne Antigen	Komplementmenge	
21 K	+++	++	++	.	.	.	+	—	KE.	
	(+++)	+	+	.	.	.	—	—	1½ KE.	
	(+++)	—	—	.	.	.	—	—	2 KE.	
19 K	.	.	+++	+++	+++	+++	+++	(+++)	KE.	
	.	.	+	+	+	+	+	+	1½ KE.	
	.	.	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	(−)	2 KE.	
									ohne Antigen und Säure	Komplementmenge
3 K	.	+++	+++	+	+	±	—	—	—	KE.
	.	+++	(+)	±	—	—	—	—	—	1½ KE.
	.	+	(+)	—	—	—	—	—	—	2 KE.

Kontrolle mit Antigen ohne Aminosäurezusatz und eine weitere Kontrolle ohne Antigen angesetzt. Aus diesem Versuch (Tabelle II) geht hervor, daß es mit der anderthalbfachen Komplementeinheit bei Zusatz von Glykokoll bis zur Verdünnung 1 : 1000 gelingt, ein vorher negatives Serum positiv zu machen. Bei Serum 3 K wurde in gleicher Weise verfahren, nur noch eine dritte Kontrolle hinzugefügt, bei der das Antigen fehlte, jedoch die Säureverdünnung 1 : 100 und 1 : 1000000 hinzugefügt waren. Die Kontrollen waren sämtlich negativ, während das Serum bei Säurezusatz in den Verdünnungen 1 : 100 bis 1 : 1000000 eine immer schwächer werdende Hemmung zeigte (Komplementeinheit), bei der anderthalbfachen Komplementeinheit aber die abgestufte Hemmung nur bis zur Verdünnung 1 : 10000 ging, um bei der doppelten Komplementeinheit bei Verdünnung der Glykokolllösung 1 : 1000 ihre Grenze zu finden. An Stelle von Glykokoll wurde nun Leucin, Tyrosin und Dimethylharnstoff in entsprechenden Verdünnungen und zwar in der Menge 0,1 ccm einem negativen Serum zugegeben. Eine Hemmung, die auf den Aminosäurezusatz zurückzuführen wäre, konnte hier nicht festgestellt werden.

Die Versuche wurden weiterhin in der Weise ergänzt, daß die Aminosäureverdünnungen in größeren Mengen (0,4 ccm) einem negativen Serum zugefügt wurden. Hier zeigt es sich nun, daß bei Glykokollzusatz nur bei der Verdünnung 1 : 10 eine deutliche Hemmung eintrat. Mit Tyrosin und Dimethylharnstoff jedoch gelang es nicht, eine Hemmung zu erzielen, während bei Zusatz von Leucin in der Menge 0,4 ccm bis zur Verdünnung 1 : 10000 eine mehr oder minder deutliche Hemmung auftrat, die aber im Gegensatz zu dem oben angeführten Glykokollversuch keine der Aminosäureverdünnung parallel gehende Abstufung der Hemmung zeigte.

Aus dieser ersten Versuchsreihe geht also hervor, daß es gelingen kann, einem negativen Serum im Reagenzglas bei Zusatz von Glykokoll (Menge 0,1 ccm Säurezusatz) bis zur Verdünnung 1 : 1000000 eine mit dem Verdünnungsgrad der Säure sich abstufende Hemmung zu verleihen. Bei Zusatz von Leucin gelingt dasselbe bis zur Verdünnung 1 : 10000 (Menge 0,4 ccm Leucinlösung), ohne daß eine der Konzentration der

zugesetzten Aminosäure parallel gehende Abstufung der Hemmung zu beobachten wäre.

II.

In einer zweiten Versuchsreihe, die allerdings mit Rücksicht auf das Tiermaterial nicht auf eine breitere Grundlage gestellt werden konnte, prüfte ich den Einfluß parenteraler Zufuhr von Aminosäuren auf den Ausfall der WaR. im Kaninchenserum. Im ersten Versuch wurden einem Kaninchen 3 ccm einer Glykokollösung 1:100 iv. eingespritzt und nach 5 Stunden beziehentlich 24 Stunden das Serum des Tieres untersucht, das vorher im Wassermannschen Versuch negativ reagiert hatte. Eine Hemmung konnte zu den der Mahloschen Versuchsanordnung entsprechenden Zeiten nicht festgestellt werden. Es wurde auch hier wieder mit Komplementabstufungen gearbeitet, um keine Hemmung, die durch Komplementüberschuß verdeckt sein konnte, zu übersehen. Ich verzichtete darauf, den von Mahlo angeführten Versuch mit Tyrosin (Verdünnung 1:50) zu wiederholen, da das Tyrosin bei dieser Konzentration nicht in Lösung geht, so daß man aus dem Ausfall der Reaktion im Serum eines derart vorbehandelten Tieres nicht berechtigt ist, auf eine Säurewirkung zu schließen.

Zwei weitere Kaninchen, deren Serum vor der Injektion positiv reagierte, wurden mit 3 ccm Leucin 1:100 und 3 ccm 1:1000 iv. vorbehandelt. Es ergab sich, daß bei dem ersten Tier (Kan. 15) die Hemmung nach 5 Stunden gleich geblieben und nach 24 Stunden sogar verstärkt war. Bei dem zweiten Kaninchen (Kan. 16) jedoch war eine deutliche Abschwächung bis zur geringen Spur einer Hemmung zu beobachten, also entsprechend den Mahloschen Versuchen.

Obwohl der letzte Versuch (Kaninchen 16) für die Richtigkeit der Mahloschen Versuchsergebnisse spricht, so möchte ich es doch ablehnen, aus diesen Befunden weitgehende Schlüsse zu ziehen. Nach meinem Dafürhalten ist das Kaninchen als Versuchstier zu derartigen Untersuchungen wenig geeignet, da der Wassermann eines nicht behandelten Kaninchens schon so häufige Schwankungen zeigt, daß es außerordentlich schwer ist, die auf Grund irgendwelcher Vorbehandlung auftretenden

Tabelle III.

	Zeit der Blutentnahme	Kompl.-Einheit	$1^1/_2$fache KE.	2 KE.	Kontrolle ohne Antigen KE.*)	$1^1/_2$ KE.	2 KE.
Kan.-No. 13	24^h vor der Injektion	—	—	—	—	—	—
	5^h später	—	—	—	—	—	—
	Injektion von 3 ccm Glykokoll 1:100	(+)	—	—	—	—	—
	5^h später	—	—	—	—	—	—
	24^h später	+	—	—	+	—	—
Kan.-No. 15	24^h vor der Injektion	+++	(++)	—	—	—	—
	5^h später	+++	++	(++)	—	—	—
	Injektion von 3 ccm Leucin 1:100	(+++)	±	—	—	—	—
	5^h später	+++	(++)	—	—	—	—
	24^h später	+++	+++	(+++)	—	—	—
Kan.-No. 16	24^h vor der Injektion	++	+	—	—	—	—
	5^h später	++	(±)	—	—	—	—
	Injektion von 3 ccm Leucin 1:1000	++	++	—	—	—	—
	5^h später	±	±	—	—	—	—
	24^h später	±	±	—	—	—	—
Kan.-No. 17	24^h vor der Injektion	—	—	—	—	—	—
	5^h später	—	—	—	—	—	—
	Injektion von MTbF. 1 ccm 1:100000	—	—	—	—	—	—
	5^h später	±	—	—	—	—	—
	24^h später	±	—	—	—	—	—

*) KE gleich Komplementeinheit.

Hemmungen als Folgeerscheinung dieser Vorbehandlung zu deuten. In diesem Sinne äußern sich auch Uhlenhuth und Mulzer (5), die außerdem beobachteten, daß bei sicher syphilitischen Kaninchen der Wassermann negativ sein kann.

Kaninchen 17 gibt lediglich eine orientiernde Nachprüfung der jüngst von Much und Schmidt veröffentlichen Versuche, in denen einem Kaninchen MTbF. 1:10000 eingespritzt und darauf nach bestimmter Frist ein Positivwerden des Kaninchenserums beobachtet wurde. Hier stand die Verdünnung 1:10000 nicht zur Verfügung; ich wählte deshalb die Verdünnung

1:100000 und gab dem Kaninchen 1 ccm iv. Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, trat 5 Stunden und 24 Stunden nach der Injektion nur eine Spur Hemmung ein, die aber doch wohl auf Kosten der Einspritzung zurückgeführt werden kann, da die Kontrollen vor der Injektion stets ein negatives Resultat zeigten. Die Much-Schmidtschen Ergebnisse, die eine deutliche Hemmung nach der Einspritzung von MTbF. 1:10000 anführen, sind wohl nicht zu bezweifeln. Ich möchte aber auch hier den oben gemachten Einwand neu betonen, daß solche positiven Ausschläge des Kaninchenserums doch nur mit Vorsicht verwertet werden können.

III.

Ich komme nun zur dritten Versuchsreihe, in der Wassermann-positive und -negative menschliche Sera (inaktiv), die zuvor enteiweißt waren, mit der Ninhydrinreaktion geprüft wurden. Die Versuchsanordnung war die, daß entsprechend der Mahloschen Methode von jedem Serum 2 ccm mit 10 ccm einer Kochsalz-Essigsäurelösung versetzt (95 ccm 2-proz. Kochsalzlösung + 5 ccm einer 3-proz. Essigsäurelösung), dann im Wasserbade 1 bis 2 Minuten gekocht wurden, bis das Eiweiß gut koaguliert war. Das Filtrat wurde in gleicher Weise noch dreimal gekocht und filtriert. Nachdem zum dritten Male gekocht worden ist, setzt man nochmals 2 ccm der Kochsalzessigsäurelösung zu, kocht und filtriert zum vierten Mal und prüft das Filtrat auf folgende Eigenschaften: Es darf das Filtrat jetzt

1) keine Biuretreaktion geben,
2) mit 30 proz. Sulfosalizylsäure keinen Niederschlag geben,
3) mit Spieglers Reagens keinen Niederschlag geben,
4) 1 Minute lang gekocht, keine Trübung geben,
5) es muß wasserklar sein.

Nun werden zu 2 ccm des letzten Filtrats, das diese Eigenschaften erfüllt, 0,2 ccm einer 1-proz. Ninhydrinlösung gegeben und genau 1 Minute lang gekocht. Ein violetter Farbumschlag bedeutet eine positive Reaktion. Zur Kontrolle wurde auch stets das destillierte Wasser, mit dem die Ninhydrinlösung hergestellt war, durch die Ninhydrinreaktion geprüft, die stets negativ ausfiel.

Ich ergänzte die Mahloschen Untersuchungen nun auch in der Richtung, daß ich nicht nur mit der vorgeschriebenen Menge von 2 ccm Serum arbeitete, sondern bis auf 0,75 ccm herunterging. Weniger Serum zu nehmen ist nicht möglich, da man sonst nicht in der Lage ist, die notwendigen Kontrollen zu machen, außerdem die Gefahr besteht, daß die kleine Filtratmenge + Ninhydrinlösung während des 1 Minute langen Kochens zum größten Teil verdampft, wobei das Reagenzglas zu springen pflegt. Es ist selbstverständlich, daß bei den geringeren Serummengen auch die zugesetzte Kochsalzessigsäurelösung in entsprechendem Verhältnis herabgesetzt wurde, ebenso die Menge der zur eigentlichen Reaktion hinzugefügten Ninhydrinlösung.

Die folgende Tabelle gibt die bei dieser Versuchsanordnung gefundenen Werte.

Tabelle IV.

Menge des Serums	Zahl der untersuchten Sera	Ausfall der WaR.	Ausfall der Ninhydrin-Reaktion	Wie viele Seren zeigen Uebereinstimmung beider Reaktionen in %?	Bemerkungen
2 ccm	15	negativ	negativ		
2 „	6	„	positiv [1])		
1,5 ccm	3	negativ	negativ		
1,5 „	2	„	positiv [2])		
1,4–0,75 ccm	7	negativ	negativ		
	2	„	positiv		
Sa.	35			25 = 71 % nach Abzug von 3 Sera in der Reihe 1: ca 79 %	
2 ccm	5	positiv	positiv		
1,5 „	3	positiv	positiv		
1,5 „	1	„	negativ		
1,4–0,5 „	20	positiv	positiv		
1,4–0,5 „	1	„	negativ		
Sa.	30			28 = 93 %	

1) 2 Sera leicht getrübt. 1 Serum von Syphilisverdachtsfall.

2) Beide Sera hämolytisch.

Es geht aus diesen Versuchen deutlich hervor, daß die Wassermann-positiven Sera eine sehr weitgehende Uebereinstimmung der WaR. mit der Ninhydrinreaktion zeigen, und zwar scheint tatsächlich die beste Uebereinstimmung erzielt zu werden, wenn man, sich streng an die Mahlosche Vorschrift haltend, mit einer Serummenge von 2 ccm arbeitet. Ich bin mir wohl darüber klar, daß es nicht angeht, die Resultate, die ich bei verschiedenen Serummengen erhalten habe, untereinander zu vergleichen. Das wäre nur erlaubt, wenn ich für jede Reihe mehrere Hunderte von Seren einander gegenüberstellen könnte. Ich muß da aber sagen, daß die Schuld nicht an mir liegt, sondern daß bekannte äußere Umstände es immer wieder illusorisch machen, die Serummengen zu erhalten, die man für groß angelegte Versuchsreihen benötigt.

Auffallend ist es nun, daß bei der Untersuchung negativer Sera die Uebereinstimmung nicht so befriedigend ist wie bei den positiven Seren. Der Grund dafür ist wohl darin zu suchen, daß man mit der Serummenge von 2 ccm sich gerade an der spezifischen Grenze der Reaktion befindet. Es geht das daraus hervor, daß ich zweimal im wiederholten Versuch bei einem sicher nicht syphilitischen Serum, dessen Ninhydrinreaktion mit der Serummenge von 2 ccm negativ war, bei der Menge von 1,25 und 1 ccm Serum stets einen positiven Ausfall der Reaktion beobachten konnte. Und zwar wurde die Farbenreaktion um so intensiver violett, je kleiner die Serummenge war. Es ist das eine Erscheinung, die ich auch bei den positiven Seren häufig auftreten sah, daß nämlich die Reaktion, wenn sie mit geringerer Serummenge angestellt wurde, eine um so stärkere Violettfärbung ergab. Die Erklärung dieser Erscheinung ist wohl einfach darin zu suchen, daß bei sehr kleinen Filtratmengen relativ um so mehr Flüssigkeit infolge des Kochens bei Anstellung der Ninhydrinreaktion verdampft, je kleiner die Filtratmenge ist, so daß die Konzentrationsverhältnisse sich ändern, und infolgedessen bei kleinen Serummengen die Ninhydrinreaktion positiv wird, beziehentlich stärker ausfällt als bei Verwendung größerer Serummengen.

Ich beginne nun mit der Kritik des in der ersten Versuchsreihe angeführten Glykokollversuchs, wo es sich zeigte, daß die Wassermann-Reaktion eine gesetzmäßig abgestufte Hemmung ergeben kann, die um so geringer war, je stärker die Verdünnung der dem negativen Serum zugesetzten Glykokollösung war. Was kann man nun aus diesem Befund für die Wassermannsche Reaktion folgern? Es läge vielleicht der keineswegs neue Gedanke nahe, daß die Wasserstoffionenkonzentration negativer und positiver Sera verschieden wäre und damit von Bedeutung für den Ausfall der Wassermannschen Reaktion. Ich führe aus der Literatur nur an, daß bereits in „Michaelis (6) die Wasserstoffionenkonzentration“ erwähnt ist, daß die sogenannte spezifische Hämolyse durch Ambozeptor und Komplement durch die Wasserstoffzahlen bedeutend beeinflußt wird. Die für diese Hämolyse wirksamste Wasserstoffzahl ist nach L. Michaelis und P. Skwirsky (7) ungefähr $2—3 \cdot 10^{-8}$, d. h. Blutalkaleszenz, während eine niedrige und besonders auch eine höhere Wasserstoffzahl die spezifische Hämolyse unterdrückt. So tritt bei einer Wasserstoffzahl von $3{,}10^{-6}$ keine Spur einer Hämolyse auf. Dabei wird der hämolytische Ambozeptor durch die Blutkörperchen durchaus gut gebunden; aber das Komplement ist unwirksam. Gegen diese Annahme aber, daß die Reaktion des Serums unter natürlichen Verhältnissen für den Ausfall der WaR. von größerer Bedeutung ist, spricht, daß die Wasserstoffzahl des Blutes (8) bei den verschiedenartigsten Erkrankungen — auch ein Fall von Hemiplegia luetica ist angeführt — in so geringen Grenzen schwankt, daß die Aenderung der Reaktion für den Ausfall der WaR. nicht in Frage kommt. Nur bei einem in tiefem Koma befindlichen Diabetiker war eine wesentliche Erhöhung der Wasserstoffzahl zu beobachten. Das Blut des lebenden Menschen hat eben die Fähigkeit, auch schon geringe Aenderungen der Reaktion, die die Aufnahme von Säure ins Blut macht, sehr schnell auszugleichen und genau die normale Wasserstoffzahl wiederherzustellen. Selbst unter pathologischen Verhältnissen (9), z. B. bei Diabetikern, die massenhaft β-Oxybuttersäure ausscheiden, kommen gröbere Abweichungen nicht vor.

Und künstlich kann man nur vorübergehend etwas größere Schwankungen hervorrufen; denn eine künstlich hervorgerufene zu große Aenderung der Wasserstoffzahl ist mit dem Leben nicht vereinbar. Anders liegen die Verhältnisse nun, wenn ich, wie in den Mahloschen Versuchen, einem Serum im Reagenzglas Säuren irgendwelcher Art hinzufüge. Die natürlichen Regulationsvorrichtungen des menschlichen oder tierischen Körpers, die in der Atmung und Nierentätigkeit liegen, fallen hier fort, so daß es nach meiner Ansicht ein Fehlschluß wäre, wollte man in den nach Zufügung einer Aminosäure zu einem negativen Serum im Reagenzglas beobachteten Hemmungen einen Vorgang erblicken, der geeignet wäre, das Wesen der Wassermannschen Reaktion zu erklären. Woran liegt es nun aber, daß es wohl mit Glykokoll gelingt, eine abgestufte Hemmung zu erzielen, dagegen mit Tyrosin und Dimethylharnstoff nicht? Der Grund liegt offenbar in der verschiedenen Reaktion der betreffenden Aminosäurenlösungen. Denn während Glykokoll gegenüber Methylorange und Phenolphthalein schwach sauer bis sauer reagiert, reagieren die anderen Aminosäuren neutral. Es handelt sich also um eine reine Säurewirkung, bei der die Hemmung dadurch eintritt, daß das Komplement geschädigt wird.

Auch die im Kaninchenversuch nach parenteraler Zufuhr von Aminosäuren beobachteten Aenderungen der ursprünglichen WaR. des Kaninchenserums geben keinen Einblick in die bei dieser Reaktion sich abspielenden Vorgänge. Man kann lediglich die Tatsache dieser Veränderungen feststellen. Die Auffassung von Much und Schmidt, daß es sich bei der WaR. um Organabbauprodukte handelt, die bei der Reaktion eine ausschlaggebende Rolle spielen sollen, ist durch diese Versuche nicht bewiesen, da es mit Glykokoll und Leucin ja auch gelingt, im Reagenzglas ein negatives Serum positiv zu machen. Für diese Ansicht spricht aber der Ausfall der Ninhydrinreaktion enteiweißter positiver Sera, der mit der WaR. gute Uebereinstimmung zeigt. Welcher Art allerdings die Stoffe des Luetikerserums sind, die diese positive Reaktion verursachen, kann nicht entschieden werden.

Verfrüht finde ich es gleichfalls, wenn Much und Schmidt aus ihren Tierversuchen, die mit MTbF. eine positive WaR.

ergaben, nun den Schluß ziehen, daß es sich bei dieser Reaktion um einen Lipoidantikörper als Ambozeptor handelt. Ich will hier nichts gegen die von Much und seinen Schülern festgestellten Lipoidantikörper an sich einwenden. Es ist aber meines Erachtens nicht angängig, bei der WaR. auf einen Lipoidantikörper zu schließen, solange die Frage noch unentschieden ist, ob es sich bei dieser Reaktion überhaupt um eine Antigen-Antikörperreaktion handelt. Weder Muchs Versuche beweisen das, noch die letzte Veröffentlichung Wassermanns (10) (Entgegnung auf Langers Einwände) vermag den endgültigen Beweis zu führen. Denn Wassermann erfüllt mit seiner neuen Wassermannschen Substanz selbst nicht die Bedingungen, die er für das Wesen eines Antikörpers aufstellt, und zwar insofern nicht, als er nicht den Nachweis führt, daß sein Antikörper das Antigen in seinen gesamten biologischen Eigenschaften oder einem Teil derselben zu neutralisieren imstande ist. Die dafür als beweiskräftig angeführte Beobachtung von Klinger und Hirschfeld, daß die gerinnungsaüslösende Wirkung, welche den Organlipoiden zukommt, sobald man sie zu einem Plasmagemisch zusetzt, quantitativ durch die im Serum der Syphilitischen enthaltene Substanz neutralisiert wird, kann nicht voll befriedigen. Denn Wassermann gibt nichts darüber an, ob es ihm auch mit seiner isolierten Wassermannschen Substanz gelungen ist, diese Erscheinung hervorzurufen. Ich habe überhaupt die Ueberzeugung, daß es auf dem bisher eingeschlagenen Wege kaum möglich ist, die Frage, ob es sich bei der WaR. um eine Antigen-Antikörperreaktion handelt, befriedigend zu lösen. Ich habe versucht, diesem Problem mit Hilfe einer anderen Methode näher zu kommen, und behalte mir vor, meine dabei gewonnenen Ergebnisse in nächster Zeit zu veröffentlichen.

Zusammenfassung.

1) Bei Zusatz von Glykokoll und Leucin zu einem vorher Wassermann-negativen Serum gelingt es, dieses Serum positiv zu machen, und zwar bei Glykokollzusatz in einem Grade, welcher der Konzentration der zugefügten Glykokollösung parallel gehen kann.

2) Es gelingt, den Ausfall der Wassermannschen Reaktion im Serum von Kaninchen durch Einspritzung von Aminosäuren sowohl wie von Partigenlipoid (MTbF.) zu beeinflussen. Die dabei erhaltenen Resultate sind jedoch nur mit Vorsicht zu verwerten, da schon das Serum nichtbehandelter Kaninchen erhebliche Schwankungen im Ausfall der WaR. zeigt.

3) Die Ninhydrinreaktion enteiweißter syphilitischer Sera stimmt gut mit der WaR. überein. Es ist möglich, daß die Reaktion an Organabbaustufen geknüpft ist, über deren Art sich jedoch nichts Sicheres aussagen läßt.

4) Es scheint uns bisher nicht einwandfrei bewiesen, daß es sich bei der WaR. um eine Antigen-Antikörperreaktion handelt; ebenso ist der sichere Nachweis, daß die Wassermannsche Substanz einen Lipoidantikörper darstellt, noch zu erbringen.

Literatur.

1) Berl. klin. Wochenschr., 1921, No. 9.
2) Ebenda, 1921, No. 14.
3) Deutsche med. Wochenschr., 1921, No. 20.
4) Beiträge zur Klinik für Infektionskrankh. und zur Immunitätsf., 1913.
5) Uhlenhuth und Mulzer, Arb. a. d. Kais. Ges.-Amt, Bd. 44, 1913.
6) Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration, 1914, p. 83.
7) Zeitschr. f. Immunitätsf., No. 4, p. 357, 629.
8) Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration, p. 102—105.
9) Ebenda, p. 92.
10) Wassermann, Berl. klin. Wochenschr., 1921, No. 14.

[Aus der bakteriologisch-hygienischen Abteilung (Abteilungsvorsteher: Prof. Dr. H. Braun) des Hygienischen Universitätsinstituts in Frankfurt a. M. (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. M. Neisser).]

Zur Biologie der Colitisbazillen.

Ein Beitrag zur Wirkungsweise der Desinfektionsmittel und des Hungers auf Bakterien.

Von **H. Braun** und **A. Gersbach.**

Mit 3 Abbildungen im Text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 13. Juli 1921.)

In früheren Arbeiten an Fleckfieber-Proteusbazillen und an Typhus- und Paratyphus B-Bazillen wurde gezeigt, daß unter dem Einfluß von bestimmten Desinfektionsmitteln, wie Karbolsäure, Thionin, Capriblau, Trypaflavin, oder unter der Einwirkung der Unterernährung diese Bakterien gewisse Agglutinogene verlieren und sich morphologisch von auf nährstoffreichen Nährböden gezüchteten Bakterien dadurch unterscheiden, daß Geißeln an ihnen nicht nachweisbar sind [Braun und Schäffer[1]), Braun[2]), Feiler[3])[4])]. Andere Veränderungen konnten an solchen Bakterien nicht nachgewiesen werden: ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber Desinfektionsmitteln und die Virulenz für Tiere blieb unverändert. Da mit dem Verluste bestimmter Agglutinogene eine Geißellosigkeit feststellbar war, lag es nahe, beide Tatsachen miteinander zu verknüpfen und anzunehmen, daß die verlorengegangenen Agglutinogene durch

1) Berl. klin. Wochenschr., 1919, No. 18.

2) Zeitschr. f. allg. Physiologie, Bd. 19, 1920, Heft 1.

3) Zeitschr. f. Immunitätsf., 1920, Heft 3/4.

4) Wie uns Versuche, die wir mit Frau Dr. Löwenstein angestellt haben, lehrten, ist bei manchen Bakterienarten für die Entwicklung der Geißeln auch die Züchtungstemperatur von großer Bedeutung. So sind z. B. manche 24-stündige Colikulturen, bei 37° gezüchtet, wenig oder gar nicht beweglich, bei 22° gewachsen dagegen lebhaft. Wir werden demnächst darüber berichten. B.

die ektoplasmatische Geißelsubstanz dargestellt werden. Direkt bewiesen war diese Annahme durch die Versuche allerdings nicht.

Zur Erläuterung des Gesagten möge als Beispiel das Verhalten der Fleckfieber-Proteusbazillen angeführt werden: Werden x_2- und x_{19}-Bazillen auf gewöhnlichem, nährstoffreichem Agar gezüchtet, so werden sie, wenn auch in quantitativ verschiedener Weise, sowohl vom x_{19}-Immunserum als auch vom x_2-Immunserum beeinflußt. Züchtet man aber die genannten Bakterien auf nährstoffarmem Agar, so werden sie jetzt nur von ihrem homologen, nicht von dem heterologen Serum agglutiniert. Sie entwickeln demnach auf nährstoffarmem Agar nur ihre Individualagglutinogene, bilden dagegen die Gruppenagglutinogene nicht aus. Da die x_2- und x_{19}-Bazillen bei der Unterernährung geißellos werden, könnte man annehmen, daß die Gruppenagglutinogene im ektoplasmatischen Geißelapparat, die Individualantigene dagegen in der Körpergrundsubstanz der Proteusbazillen enthalten sind.

Wie verhalten sich nun geißellose Bakterien unter der Einwirkung der oben erwähnten Desinfektionsmittel oder bei Anwesenheit geringer Nährstoffmengen? Der ektoplasmatische Geißelapparat ist, wie gezeigt worden ist, kein lebensnotwendiges Organ. Befindet sich der Mikroorganismus in schlechten Ernährungsverhältnissen, dann verzichtet er auf den Aufbau des Geißelapparates und verwendet die zu seiner Entstehung notwendigen Nährstoffe zur Bildung solcher Leibesbestandteile, die er im Leben nicht missen kann. Treten nun bei geißellosen Bakterien andere Leibesbestandteile vikariierend für den Geißelapparat ein?

Nicht nur vom theoretischen, sondern auch vom praktischen Gesichtspunkte aus scheinen uns solche Versuche von Interesse zu sein. Wir wissen ja, daß manche pathogenen Bakterien im kranken Menschen und Tiere nicht immer die günstigen Lebensbedingungen vorfinden, die ihnen in den künstlichen Kulturen zur Verfügung stehen. Das menschliche Serum ist z. B. für die Typhusbazillen bekanntlich kein besonders günstiger Nährboden. Solche in der Blutflüssigkeit keine guten Ernährungsbedingungen vorfindenden Keime werden demnach öfters in biologischer Hinsicht den Hunger-

bakterien mehr ähneln als den in nährstoffreichen künstlichen Kulturen gezüchteten Krankheitserregern. Das wird aber für die Antikörperbildung im kranken infizierten Körper, wenn gewisse Agglutinogene fehlen, nicht ohne Bedeutung sein. In diesem Sinne lassen sich Tierexperimente mit den Weil-Felixschen Fleckfieber-Proteusbazillen verwerten, die von Friedberger[1]), Seiffert[2]) und von v. Gutfeld[3]) ausgeführt worden sind. Diese Autoren zeigten, daß, wenn Tieren unter besonderen Bedingungen geißelhaltige Proteusbazillen injiziert werden, aus diesen geißellose O-Formen (Weil und Felix) gezüchtet werden können. Auch für die Entstehung der erworbenen Immunität gegen geißeltragende Bakterien könnten diese Tatsachen von Wichtigkeit sein. Immunsera, die stark wirksam sind auf geißelhaltige Kulturbakterien, müßten es nicht immer gegenüber den im Körper des Infizierten entstehenden, anders aufgebauten „Hungerbakterien" sein. Es wird zu untersuchen sein, ob für die Herstellung von Impfstoffen zur aktiven Immunisierung und zur Herstellung von Heilsera gegen bestimmte Infektionserreger Hungerbakterien nicht geeigneter sind als die auf nährstoffreichen Nährböden gezüchteten Krankheitserreger.

I.

Zu den Versuchen mit geißellosen Bakterien haben wir einen Stamm von Colitisbazillen gewählt, der nach der Einteilung von Kruse als Pseudodysenterie-Bazillus Rasse H zu bezeichnen wäre, und den wir im folgenden der Kürze halber als „Kruse-H" bezeichnen wollen. Er zeigte die für Colitisbazillen typischen morphologischen und kulturellen Eigenschaften [Braun und Ließ[4])]. Diesen Stamm züchteten wir auf nährstoffreichem, nährstoffarmem und karbolisiertem Agar in täglichen Passagen.

Unser gewöhnlicher Nähragar wird jetzt nicht aus Fleischwasser, sondern aus Plazentawasser hergestellt (1 kg Plazenta auf 2 Liter Wasser). Dazu kommt ca. 1 Proz. Pepsinpepton, 0,5 Proz. künstlicher Fleischextrakt,

---

1) Naturforscherversammlung 1920.
2) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 30, 1921, Heft 5/6.
3) Berl. klin. Wochenschr., 1921, No. 25.
4) Zeitschr f. Hyg. u. Inf., Bd. 88, 1919.

0,5 Proz. Kochsalz und $2^1/_2$ Proz. Agar. Alkalisiert wird mit Normal-Sodalösung. Der „Hungeragar" wurde so hergestellt, daß man zu einer 2-proz. Agarlösung (20 g Stangenagar in 500 ccm Aq. dest. + 500 ccm steriles Leitungswasser) geringe Mengen gewöhnlicher Bouillon zusetzte. Zunächst wurde die Menge der Bouillon bestimmt, deren Zusetzen zur Agarlösung noch zum Wachstum des Kruse-H-Stammes genügte. Es zeigte sich, daß er noch bei einer Menge von 0,5 ccm Bouillon auf 10 ccm Agarlösung dauernd in Passagen züchtbar war. Bei geringerer Bouillonmenge (0,1—0,25 ccm auf 10 ccm Agar) ließ sich noch ein spärliches Wachstum erzielen, aber die Kulturen waren nicht dauernd in Passagen zu erhalten. Was den Karbolagar betrifft, so bestimmten wir zunächst die höchstzulässige Menge Karbolsäure, die dem gewöhnlichen Agar zugesetzt, noch Wachstum in Passagen zuließ. Dazu erwiesen sich 3 ccm der 5-proz. Karbolsäurelösung auf 100 ccm unseres gewöhnlichen Agars als geeignet.

Wir möchten zunächst das morphologische Verhalten des Kruse-H-Stammes auf den drei Nährböden beschreiben. Bereits im ungefärbten Präparat, im hängenden Tropfen oder im Collargolaustrichpräparat, konnte man zwischen den drei verschiedenen Stämmen Unterschiede nachweisen. Wir wollen im folgenden, um uns kürzer auszudrücken, die auf gewöhnlichem Agar gezüchteten Bakterien als den Ausgangsstamm, die auf Karbolagar gezüchteten als den Karbolstamm und die auf Hungeragar gezüchteten als den Hungerstamm bezeichnen. Besonders auffällige Veränderungen wies der Karbolstamm auf. Schon in der ersten Passage zeichnete er sich durch ausgesprochene Fadenbildung aus. Die Fäden sind verschieden lang und des öfteren von bizarrster Gestalt. Manche von ihnen stellen langgezogene Spindeln dar, andere sind kugel-

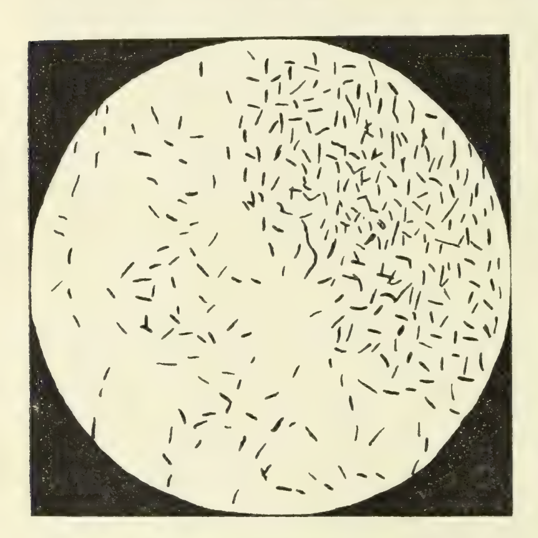


Fig. 1. Ausgangsstamm.

förmig aufgetrieben. Manche Fäden sind von so beträchtlicher Länge und Breite, daß sie in ihrer Gestalt an einzellige Lebewesen, wie z. B. an Trypanosomen, erinnern. Im Hungeragar fällt demgegenüber die außerordentliche Kürze der einzelnen Individuen auf. Wenn auch die Länge der einzelnen Stäbchen schwankt, so überwiegen doch die kurzen plumpen, kokkenähnlichen. Die Bakterien auf gewöhnlichem Agar zeigen verschiedene Länge. Meistens handelt es sich um mittellange, schmale Stäbchen. Fäden sind spärlich vorhanden. (Fig. 1, 2, 3.)



Fig. 2. 110. Passage des Karbolstammes.

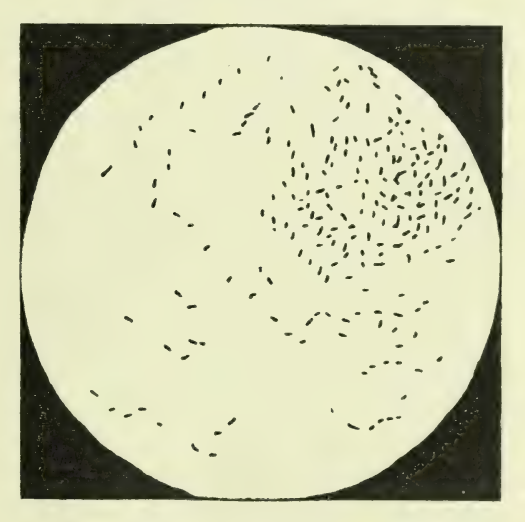


Fig. 3. 110. Passage des Hungerstammes.

Auch die innere Struktur der unter verschiedenen Bedingungen gezüchteten Bakterien ist nicht die gleiche. Wir werden weiter unten bei der Besprechung der Untersuchung gefärbter Präparate auf die innere Struktur noch eingehen. Hier möge nur hervorgehoben werden, daß die dort besprochenen Verschiedenheiten

im inneren Aufbau bereits im ungefärbtem Präparat wahrzunehmen sind.

Was die Färbbarkeit nach Gram betrifft, so fällt es auf, daß die Karbolbakterien bei der Alkoholentfärbung den Farbstoff schlechter abgeben als die unter anderen Zuchtbedingungen aufgewachsenen Bakterien. Vor allem zeigen die breiten Spindelformen und die aufgetriebenen Bakterienfäden eine schlechte Entfärbbarkeit. Sie erscheinen bei der Gentianaviolettfärbung mit nachfolgender Fuchsinfärbung nach Gram nicht leuchtend rot, sondern rotviolett.

Die Riesenformen der Bakterien, die auf dem Karbolagar auftreten, schienen uns geeignet zu sein, eingehendere Untersuchungen über die Struktur der Bakterien auszuführen und zu prüfen, ob nicht in solchen Bakterienformen eine Differenzierung in Kern und Protoplasma gelingt. Zu diesem Zwecke haben wir zunächst Färbungen mit Eisenhämatoxylin nach Heidenhain ausgeführt. Wir waren uns natürlich dessen bewußt, daß es sich um abnorme, wie man meist annimmt, degenerierte Bakterien handelt. Letzterer Ansicht können wir uns allerdings aus Gründen, die später angeführt werden, nicht ohne weiteres anschließen. Wie vorweggenommen werden mag, ließen sich in den großen, breiten Formen der Karbolstammkulturen irgendwelche sicher als Kerne oder Kernäquivalente zu deutende Gebilde nicht feststellen. Das Protoplasma dieser Bakterien zeigte zumeist einen retikulären Bau; die einzelnen Protoplasmastränge waren von verschiedener Breite, und bei starker Vergrößerung sah man, daß das Protoplasma aus Körnchen verschiedener Größe besteht. Zwischen diesen nach Heidenhain graubraun färbbaren Protoplasmasträngen befinden sich farblose Stellen, die, wie wir glauben, nicht immer leeren Lücken entsprechen. Denn wenn wir die Heidenhain-Präparate mit verdünnter Ziehlscher Fuchsinlösung nachfärbten, konnte man häufig sehen, daß die Lücken zwischen den Protoplasmasträngen den Fuchsinfarbstoff aufgenommen haben. Ob es sich um Flüssigkeitsvakuolen handelt oder um Protoplasma anderer Konsistenz als das, welches nach Heidenhain färbbar ist, können wir nicht entscheiden. Die Auftreibungen der Fäden wiesen sehr häufig eine homogene dunkelgrauschwarze Färbung auf. Sie scheinen aus besonders

dichtem Protoplasma zu bestehen. Die Bakterienmembran war bei dem Färbeverfahren nach Heidenhain deutlich wahrnehmbar. Auffällig war bisweilen die Erscheinung, daß die Fäden durch farblose Septa in einzelne selbständige Abteilungen geteilt waren, so daß wir annehmen müssen, daß ein solcher Faden kein Einzelindividuum ist, sondern aus einer größeren Zahl von Einzelbakterien besteht.

Bei der Heidenhainfärbung des Ausgangs- und Hungerstammes fehlte die retikuläre Struktur des Bakterienprotoplasmas und die deutliche Membran. Diese Bakterien erschienen meist gleichmäßig und nur an beiden Polen etwas intensiver gefärbt.

Wir versuchten nun mit Hilfe der sog. intravitalen Färbung zu prüfen, ob zwischen dem Ausgangs-, dem Karbol- und Hungerstamm Strukturdifferenzen nachweisbar sind. Wir benutzten zu diesem Zwecke Stämme, die längere Zeit — in 80 bis 90 Passagen — unter Hunger resp. unter Karbolsäureeinwirkung gezüchtet worden sind. Als Farbstoffe wählten wir Lösungen von Methylenblau, Fuchsin und Viktoriablau 4 R in physiologischer Kochsalzlösung. Es gelang in der Tat, gewisse Unterschiede festzustellen, die einerseits zwischen den verschiedenen Bakterienmodifikationen zu beobachten waren, und die andererseits nur bei Verwendung bestimmter Farbstoffe auftraten. Von Methylenblau erwies sich hierzu eine Lösung von 1 Teil Methylenblau med. Höchst in 1000 Teilen physiologischer Kochsalzlösung als geeignet. Der Ausgangsstamm und der Hungerstamm zeigten nach einer halb- bis einstündigen Einwirkungszeit einer solchen Methylenblaulösung eine deutliche Färbung. Eine charakteristische Struktur war in ihnen nicht wahrnehmbar. Häufig fand man eine Anhäufung des Farbstoffes an den beiden Polen, während sich in der Mitte eine schwächer oder nicht gefärbte Lücke befand. Anders verhielt sich unter diesen Umständen der Karbolstamm. Er zeigte bei sehr vielen Individuen eine deutliche Innenstruktur. Man sah ein von ungleicher Intensität blau gefärbtes Netzwerk und dazwischen Lücken wechselnder Form und Größe. Es traten Bilder auf, die sich mit denen deckten, die wir im fixierten Präparat bei der Heidenhainfärbung zu Gesicht bekamen. Es handelt sich demnach bei

den in Heidenhainpräparaten auftretenden Strukturen nicht um Kunstprodukte.

Besonders auffällig war bei diesen Versuchen die Tatsache, daß sich der Karbolstamm intravital weniger intensiv färben ließ als der Ausgangs- und der Hungerstamm.

Zu diesen Versuchen schwemmten wir je ein Agarröhrchen des Ausgangsstammes mit 5 ccm Farbstofflösung ab, bei den Versuchen mit Karbol- und Hungerstamm benutzten wir mit Rücksicht auf das viel schwächere Wachstum 1 ccm der Farblösung. Aus diesen Aufschwemmungen entnahmen wir zu verschiedenen Zeiten je drei hängende Tropfen, die nacheinander im Mikroskop untersucht wurden.

Was das Fuchsin betrifft, so haben wir dazu Lösungen von 1 Teil Fuchsin in 100 Teilen physiologischer Kochsalzlösung benutzt. Besondere Strukturen ließen sich mit diesem Farbstoff nicht feststellen. Besonders auffällig trat aber auch hier die schlechte Färbbarkeit des Karbolstammes auf. Am besten nahm den Farbstoff der Ausgangsstamm auf, dann kam der Hungerstamm, dagegen blieb der Karbolstamm häufig nach einstündiger Einwirkung größtenteils farblos, und erst nach stundenlanger Einwirkung erschien der Faden blaßrosa gefärbt mit wechselndem Gehalt an dunkelschwarzen Körnchen.

Die Färbungen mit Viktoriablau 4 R ergaben ähnliche Resultate, wie die mit Fuchsin. Da es sich hierbei um einen Farbstoff mit sehr großem Molekül handelt, so war die Diffusion in das Bakterium gegenüber Methylenblau deutlich verlangsamt. Das traf sowohl für den Ausgangs- und Hungerstamm als vor allem für den Karbolstamm zu. Erst nach mehrstündiger Einwirkung einer 1-proz. Farbstofflösung waren die Fäden des Karbolstammes blaßblau gefärbt. Strukturen, wie die in den mit Methylenblau gefärbten Präparaten, waren nicht nachweisbar. Es traten kugelige Farbstoffansammlungen im Bakterienleib auf, ähnlich denen bei der Fuchsinfärbung. Ausgangsstamm und Hungerstamm nahmen den Farbstoff bereits nach einigen Stunden auf und erschienen blaßblau gefärbt mit etwas intensiverer Färbung der Polenden. Die kugelförmigen Farbstoffanhäufungen, wie sie im Karbolstamm auftraten, sind beim Ausgangs- und Hungerstamm, wenn überhaupt, nur äußerst selten wahrzunehmen gewesen.

Wenn wir das Ergebnis der morphologischen Untersuchung zusammenfassen, so ergibt sich folgendes: Strukturen, die auf einen Bau aus Protoplasma und Kern schließen ließen, konnten in den unter dem Einfluß der Karbolsäure entstandenen Riesenformen nicht nachgewiesen werden. Auch ließ sich keine Konstanz im Aufbau des Bakterienleibes beim Karbolstamm feststellen, und das Protoplasma war in mannigfaltiger Form netzförmig oder klumpenförmig im Bakterienleib verteilt. Auch die Vakuolen waren weder in ihrer Größe noch in ihrer Form beständig. Beim Ausgangsstamm und Hungerstamm war eine wabige Struktur nicht feststellbar. Bemerkenswert war das differente färberische Verhalten des Karbolstammes gegenüber dem Ausgangs- und Hungerstamm; der Karbolstamm war bei der intravitalen Färbung viel schwerer färbbar und bei der Gramfärbung schwerer entfärbbar als die anderen Stämme.

II.

Wir haben in der Einleitung bereits ausgeführt, weshalb wir dem serologischen Verhalten der Colitisbazillen bei Züchtung auf karbolhaltigen und nährstoffarmen Nährböden besonderes Interesse entgegenbringen. Bei den Untersuchungen mit Proteus-, Typhus- und Paratyphus B-Bazillen zeigte es sich, daß diese Mikroorganismen unter solchen Bedingungen die Geißeln und mit ihnen gewisse Agglutinogene verlieren. Was geschieht mit den geißellosen Colitisbazillen unter denselben Umständen? Zu diesem Zwecke haben wir zunächst Agglutinationsversuche ausgeführt und zwar mit Immunsera, die mit dem Ausgangs- und mit dem Karbolstamm hergestellt worden waren. Als Beispiel mögen in der folgenden Tabelle I zwei Prüfungen, die eine mit einem Immunserum (= I.S.) des Ausgangsstammes, die andere mit einem I.S. des Karbolstammes gegen den Ausgangsstamm, Karbol- und Hungerstamm mitgeteilt werden.

Tabelle I.

Agglutinationsversuch des Ausgangsstamm-Immunserums und des Karbolstamm-Immunserums mit Ausgangsstamm, Karbolstamm und Hungerstamm.

Zum Versuch wurden benutzt:

1) Kaninchen-Immunserum, gewonnen durch Injektion von mit Aether abgetöteten Colitisbazillen: Stamm Kruse-H, gezüchtet auf gewöhnlichem Agar (Ausgangsstamm),

2) Kaninchen-Immunserum, gewonnen durch Injektion von mit Aether abgetöteten Colitisbazillen, gezüchtet auf 1-prom. Karbolagar (Karbolstamm),

3) Kochsalzabschwemmungen gleicher Dichte vom Ausgangsstamm (= A.St.), Karbolstamm (= K.St.) und Hungerstamm (= H.St.) in 72. Passage.

1. Ausgangsstamm-Immunserum.

Ergebnis nach 24 Stunden:

	Serum-verdünnungen	A.-St	K.-St.	H.-St.
1	1:100	+++	+++	+++
2	1:200	++	++	++
3	1:400	schwach +	+	schwach +
4	1:800	schwach +	schwach +	(+)
5	1:1600	(+)	(+)	schwach (+)
6	1:3200	0	schwach (+)	0
7	1:6400	0	sehr schwach (+)	0
8	1:12800	0	0	0
9	K	0	0	0

2. Karbolstamm-Immunserum.

Ergebnis nach 24 Stunden:

	Serum-verdünnungen	A.-St.	K.-St.	H.-St.
1	1:100	++	++	++
2	1:200	+	++	+
3	1:400	+	++	schwach +
4	1:800	+	+	schwach +
5	1:1600	schwach +	+	(+)
6	1:3200	sehr schwach +	schwach +	(+)
7	1:6400	(+)	(+)	sehr schwach (+)
8	1:12800	0	sehr schwach (+)	0
9	1:25600	0	0	0
10	K	0	0	0

Zeichenerklärung: Stärkste Agglutination, bei der die Bakterien in Klumpen und Flocken zu Boden gerissen waren und die überstehende Flüssigkeit völlig klar war, bezeichneten wir als +++; eben noch mit dem Auge wahrnehmbare Agglutination als sehr schwach +; die Zwischengrade als ++, +. Mit der Lupe wahrnehmbare Agglutination bezeichneten wir je nach der Stärke (+), schwach (+) und sehr schwach (+).

Aus den Agglutinationsversuchen ergab sich folgendes: Das Ausgangsimmunserum beeinflußte seinen homologen Stamm und den Hungerstamm in gleicher Titerhöhe. Der Karbolstamm wurde von diesem Serum des öfteren etwas höher agglutiniert. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, daß

der Karbolstamm leichter als die beiden anderen Stämme ausflockbar ist. Denn manchmal tritt schon in der Kochsalzkontrolle dieses Stammes Spontanagglutination auf. Ganz das gleiche Ergebnis wie die Immunsera des Ausgangsstammes zeigten auch die des Karbolstammes. Der Karbolstamm wurde von diesen Immunsera zwar öfters höher agglutiniert als die beiden anderen Stämme, aber der Unterschied war kein großer, so daß kein Anlaß vorhanden ist, eine andere Erklärung als die der leichteren Ausflockbarkeit des Karbolstammes anzunehmen.

Um aber die Richtigkeit dieser Deutung sicherzustellen, haben wir Absorptionsversuche ausgeführt. Wir haben das Ausgangsimmunserum einerseits mit dem Ausgangsstamm und andererseits mit dem Karbolstamm behandelt und die erschöpften Sera auf ihren Agglutiningehalt untersucht. Es stellte sich heraus, daß sie sowohl durch die Behandlung mit dem Ausgangsstamm, wie auch durch die mit dem Karbolstamm aller Agglutinine beraubt wurden. Sie vermochten dann weder den einen noch den anderen Stamm zu agglutinieren.

Die Agglutinations- und Absorptionsversuche mit den Colitisbazillen haben also ein anderes Ergebnis geliefert als die mit Proteus-, Typhus- und Paratyphus B-Bazillen ausgeführten. Es sei daran erinnert, daß z. B. ein Immunserum, hergestellt mit einem auf gewöhnlichem Agar gezüchteten Proteusstamm, wohl von diesem, aber nicht vom Karbolstamm aller Agglutinine beraubt wird. Es büßt zwar bei Behandlung mit letzterem die Agglutinine für den Karbolstamm vollständig ein, es bleiben aber Agglutinine zurück, die allein auf den Ausgangsstamm passen. Das ist, wie die Versuche zeigten, bei den Colitisbazillen nicht der Fall. Hier ist ein Verlust der Agglutinogene durch Züchtung auf karbolhaltigen oder nährstoffarmen Nährböden mit Hilfe der Agglutination nicht nachweisbar. Leibesbestandteile also, die agglutinogenen Charakter haben, gehen bei Colitisbazillen unter der Einwirkung von Karbolsäure oder Hunger nicht verloren. Es besitzen demnach die Colitisbazillen keinerlei Leibesbestandteile von agglutinogenem Charakter, die zum Leben unnötig wären, wie dies bei geißeltragenden Proteusbazillen usw. der Fall ist.

Mit den Ergebnissen unserer Versuche steht im Einklang, was Weil und Felix[1]) angeben, die „in orientierenden Versuchen bei Cholera und Dysenterie“ nur kleinflockende Agglutinine in Immunseris nachweisen konnten.

Wir haben weiterhin einige Versuche zur Beantwortung der Frage ausgeführt, ob bei der Züchtung unter abnormen Ernährungsbedingungen die den verschiedenen Rassen der Ruhrbakterien gemeinsamen Gruppenagglutinogene verloren gehen, die Individualagglutinogene erhalten bleiben. Wir benutzten dazu Immunsera, die mit Colitisbazillen hergestellt waren, welche agglutinatorische Gemeinsamkeiten mit dem Kruse-H-Stamm hatten. Auf die Wiedergabe der Versuche möchten wir deshalb verzichten, weil sich zeigte, daß bei den Karbol- und Hungerstämmen ein Verlust der Mitagglutinogene nicht nachweisbar war. Es bleiben also sowohl die Individual-, wie die Gruppenagglutinogene erhalten.

Nachdem festgestellt wurde, daß im Gegensatz zu Proteus-, Typhus- und Paratyphus B-Bazillen bei Colitisbazillen durch Ernährungsstörung kein Verlust von Agglutinogenen eingetreten ist, prüften wir, ob mit einer anderen serologischen Untersuchungsmethode Unterschiede im Antigengehalt feststellbar sind, und wählten dazu die Präzipitation.

Wir legten Massenkulturen vom Ausgangs-, Karbol- und Hungerstamm an, schwemmten diese in physiologischer Kochsalzlösung auf und stellten uns gleiche Mengen von Sedimenten von allen drei Stämmen her. Die Bodensätze wurden dann mit gleicher Menge physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen, mit Aether überschichtet und 24 Std. bei Bruttemperatur mazeriert. Danach wurde scharf zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit abgegossen. Wir haben solche Extrakte zur Untersuchung der Immunsera, die entweder mit dem Ausgangsstamm oder mit dem Karbolstamm hergestellt waren, auf Präzipitine benutzt.

Die Präzipitationsversuche sind nicht immer in gleicher Weise ausgefallen. Die Extrakte zeigten des öfteren in ihrer Wirksamkeit Unterschiede, und zwar insofern, als sich häufig am wirksamsten der Extrakt des Ausgangsstammes, dann der des Hungerstammes und am schwächsten der des Karbolstammes erwies. Diese Differenzen sind aber nie groß gewesen und traten nicht regelmäßig auf, so daß wir geneigt sind, die Unterschiede auf technische Ungenauigkeiten zurück-

1) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 29, 1920.

zuführen, die bei der Herstellung der Extrakte unvermeidbar sind. Es ist praktisch nicht möglich, absolut gleiche Mengen der Bakterien durch Zentrifugieren zu gewinnen, auch wenn man die größte Achtsamkeit der Sache widmet. Aber schon dieser Umstand genügt, um geringe Schwankungen in dem Antigengehalt der Extrakte herbeizuführen. Das Ergebnis dieser Versuche war, daß auch mit Hilfe der Präzipitation deutliche und stets wiederkehrende Unterschiede zwischen dem Ausgangs-, Karbol- und Hungerstamm nicht nachweisbar waren. Deshalb verzichten wir auf die Wiedergabe der Versuche.

Komplementbindungsversuche führten zu keinem brauchbaren Resultat, weil die verwendeten Immunsera nur sehr geringe komplementbindende Fähigkeiten zeigten.

III.

Nachdem also die serologischen Untersuchungen gezeigt hatten, daß die Colitisbazillen zum Unterschied von Typhus-, Paratyphus B- und Proteusbazillen unter dem Einfluß der Karbolsäure und der Unterernährung keinerlei Leibesbestandteile von Agglutinogencharakter verlieren, prüften wir, ob in anderer Hinsicht, vor allem in bezug auf die Giftigkeit und die Infektiosität, Veränderungen eintreten. Die Infektions- und Toxizitätsprüfungen wurden an weißen Mäusen ausgeführt. Für die Infektionsversuche benutzten wir Aufschwemmungen von Agarkulturen, die in absteigenden Mengen intraperitoneal einverleibt wurden. Da die Colitisbazillen von geringer Virulenz für Mäuse sind, mußten größere Mengen injiziert werden. Wir gingen folgendermaßen vor:

Eine Kultur des Ausgangsstammes wurde in 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt, und davon wurden 0,5, 0,25, 0,1 ccm i.p. injiziert. Vom Karbol- und Hungerstamm stellten wir uns Aufschwemmungen gleicher Dichte wie die des Ausgangsstammes her. In der Regel mußten wir dazu 5 Röhrchen in 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufschwemmen und injizierten dann die gleichen Mengen wie beim Ausgangsstamm.

Die Dosis 0,1 ccm erwies sich bei allen drei Stämmen in der Regel als nicht mehr krankheitserregend. 0,25 ccm tötete bei allen drei Stämmen. Trotz der Züchtung unter der Einwirkung der Karbolsäure und unter dem Einfluß der Unterernährung hat sich also die Infektiosität des Colitis-

bazillus nicht geändert. Es konnte weder eine Abnahme noch eine Zunahme der Virulenz festgestellt werden. Man hätte entweder annehmen können, daß die ungünstigen Lebensverhältnisse zu einer Abschwächung der Virulenz führen würden, oder daß unter den ungünstigen Bedingungen gerade die virulentesten Keime erhalten bleiben. Nichts derartiges trat ein.

Die Toxizität der verwendeten Colitisbazillen prüften wir mit Waschwassergiften.

Wir stellten uns Kochsalzextrakte auf folgende Weise her: Wir schwemmten 24-stündige Schrägagarkulturen mit physiologischer Kochsalzlösung ab, schüttelten die Abschwemmung eine Stunde im Schüttelapparat, überschichteten mit Aether und ließen sie zwei Tage bei Brutschranktemperatur stehen. Dann wurde die Sterilitätsprobe angesetzt und darauf scharf zentrifugiert. Die so hergestellten Extrakte injizierten wir in verschiedenen Mengen weißen Mäusen von 15—20 g in die Schwanzvene, und zwar 0,3, 0,2, 0,1 ccm.

Die Versuche mit Extrakten aus dem Ausgangsstamm, Karbol- und Hungerstamm, wenn sie aus gleichen Bakterienmengen hergestellt waren, ergaben die gleiche Giftigkeit. Als giftig erwies sich bei allen drei Stämmen in der Regel die Menge des Extraktes von 0,3 ccm.

IV.

Um nun zu prüfen, ob die unter ungünstigen Lebensverhältnissenen aufgewachsenen Colitisbazillen in ihrer Lebensfähigkeit geschädigt sind, gingen wir dazu über, ihre Wiederstandsfähigkeit gegenüber Desinfektionsmitteln im Hemmungs- und Abtötungsversuch zu prüfen, und zwar zunächst gegenüber Karbolsäure und Sublimat. Es zeigte sich, daß alle drei Stämme in der Konzentration der Karbolsäure von 1 : 400 in der Nährbouillon im Wachstum gehemmt wurden und in der Konzentration 1 : 1000 wuchsen. Bei Sublimat ergab sich ein analoges Resultat insofern, als auch hierbei zwischen Ausgangs-, Karbol- und Hungerstamm keine Unterschiede feststellbar waren. Die hemmenden Konzentrationen waren natürlich wegen der stärkeren Wirksamkeit des Sublimates höher. Die Verdünnung des Sublimates, in der vollständige Hemmung eingetreten war, war nicht bei allen Stämmen immer dieselbe, aber die Unterschiede bewegten sich in den Fehlergrenzen der Methode und zwar zwischen 1 : 100000 und 1 : 200000.

Im Anschluß an die Hemmungsversuche haben wir Abtötungsversuche mit Karbolsäure ausgeführt. Diese fielen nicht übereinstimmend aus. Das liegt gleichfalls an den Fehlern der Methode der Abtötungsversuche. Besonders schwer ist es, bei den hier untersuchten verschiedenartigen Kulturen gleiche Anzahl der Bakterienindividuen in das Desinfektionsmittel einzusäen. Man kann nur so quantitativ vorgehen, daß man Aufschwemmungen von gleicher Dichte macht. Da aber die Bakterien, wenn sie unter verschiedenartigen Bedingungen gezüchtet werden, verschiedene Größe haben, so wird auch in gleich dichten Suspensionen eine verschiedene Anzahl von Individuen sein müssen, die außerdem von Versuch zu Versuch schwankt. In manchen Versuchen schien der Ausgangsstamm eine etwas größere Widerstandsfähigkeit als der Karbol- und Hungerstamm zu zeigen; in anderen waren alle drei Stämme gegenüber Karbolsäure gleich empfindlich. Als Beispiel für die Andeutung einer gewissen Widerstandsfähigkeit des Ausgangsstammes möge kurz folgender Versuch mitgeteilt werden.

Tabelle II.

Abtötungsversuch mit $^1/_2$-proz. Karbolsäure.

Zum Versuch wurden benutzt:

1) $^1/_2$-proz. Karbolsäure,

2) Kochsalzabschwemmungen gleicher Dichte vom Ausgangsstamm, Karbolstamm und Hungerstamm der 38. Passage.

Versuchsanordung:

In je 5 ccm einer $^1/_2$-proz. Karbolsäurelösung wurden je 5 Tropfen gleich dichter Kochsalzabschwemmung des Ausgangsstammes, Karbolstammes und Hungerstammes eingesät. Nach verschiedenen, im Protokoll angegebenen Zeiten wurde je eine Oese auf 2 Löfflerserumröhrchen abgeimpft. Die Röhrchen wurden 7 Tage lang beobachtet.

1. Ausgangsstamm.

Ergebnis:	sofort		nach 10 Min.		nach 15 Min.		nach 20 Min.		nach 30 Min.	
Löffler-serum-Röhrchen:	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
1. Tag	sehr stark +	sehr stark +	sehr stark +	sehr stark +	stark +	stark +	sehr schwach +	schwach +	—	—
3. Tag	.	.	.	.	.	.	.	.	—	—
5. Tag	.	.	.	.	.	.	.	.	—	—
7. Tag	.	.	.	.	.	.	.	.	—	—

2. Karbolstamm.

Ergebnis:	sofort		nach 10 Min.		nach 15 Min.		nach 20 Min.		nach 30 Min.	
Löffler-serum-Röhrchen:	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
1. Tag	sehr stark +	sehr stark +	schwach +	schwach +	sehr schwach +	sehr schwach +	—	—	—	—
3. Tag	.	.	.	.	.	.	—	—	—	—
5. Tag	.	.	.	.	.	.	—	—	—	—
7. Tag	.	.	.	.	.	.	—	—	—	—

3. Hungerstamm.

Ergebnis:	sofort		nach 10 Min.		nach 15 Min.		nach 20 Min.		nach 30 Min.	
Löffler-serum-Röhrchen:	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
1. Tag	sehr stark +	sehr stark +	schwach +	sehr schwach +	—	—	—	—	—	—
3. Tag	.	.	.	.	—	—	—	—	—	—
5. Tag	.	.	.	.	—	—	—	—	—	—
7. Tag	.	.	.	.	—	—	—	—	—	—

Wie wir bei der Besprechung der intravitalen Färbung gesehen haben, besaß der Karbolstamm eine geringere Aufnahmefähigkeit für die Farbstoffe als der Ausgangs- und Hungerstamm. Da Methylenblau bakterientötende Fähigkeiten besitzt, prüften wir, ob sich die schwere Färbbarkeit des Karbolstammes mit einer Widerstandsfähigkeit gegenüber der abtötenden Wirkung des Methylenblaues verknüpft findet. Als Beispiel möge folgender Versuch wiedergegeben werden.

Tabelle III.

Abtötungsversuch mit Methylenblau 1:1000.

Zum Versuche wurden benutzt:

1) Methylenblaulösung in der Konzentration 1:1000,

2) Kochsalzabschwemmungen gleicher Dichte von Ausgangsstamm, Karbolstamm und Hungerstamm der 101. Passage.

Versuchsanordnung:

In je 5 ccm einer Methylenblaulösung 1:1000 wurden je 5 Tropfen gleich dichter Kochsalzabschwemmungen des Ausgangsstammes, resp. Karbolstammes oder Hungerstammes eingesät. Nach verschiedenen im Protokoll angegebenen Zeiten wurde je eine Oese auf ein Agar- und ein Löfflerserumröhrchen abgeimpft und gleichzeitig eine Oese im hängenden Tropfen

mikroskopisch untersucht. Die Agar- und Löfflerröhrchen wurden 7 Tage lang beobachtet. Zur Kontrolle wurden dieselben Bakterien in je 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung eingesät und nach im Protokoll angegebenen Zeiten auf Agar- und Löfflernährböden verimpft.

1. Ausgangsstamm.

	Methylenblau:						Kochsalzkontrollen:	
Ergebnis:	sofort		nach 1 Std.		nach 8 Std.		sofort	n. 8 Std.
Färbung:	keine Färbung		sehr geringe blaßblaue Färb.		tiefblaue Färbung			
Wachstum auf:	Agar	Löffler	Agar	Löffler	Agar	Löffler	Agar	Agar
1. Tag	sehr stark +	sehr stark +	+	stark +	—	1 Kolonie	sehr stark +	sehr stark +
3. Tag	.	.	.	.	—	3 Kolonien	.	.
5. Tag	.	.	.	.	—	—	.	.
7. Tag	.	.	.	.	—	—	.	.

2. Karbolstamm.

	Methylenblau:						Kochsalzkontrollen:	
Ergebnis:	sofort		nach 1 Std.		nach 8 Std.		sofort	n. 8 Std.
Färbung:	keine Färbung		keine Färbung		schwach blaßblaue Färbung			
Wachstum auf:	Agar	Löffler	Agar	Löffler	Agar	Löffler	Agar	Agar
1. Tag	sehr stark +	sehr stark +	+	stark +	+	stark +	sehr stark +	sehr stark +
3. Tag	.	.	.	.	.	.	.	.
5. Tag	.	.	.	.	.	.	.	.
7. Tag	.	.	.	.	.	.	.	.

3. Hungerstamm.

	Methylenblau:						Kochsalzkontrollen:	
Ergebnis:	sofort		nach 1 Std.		nach 8 Std.		sofort	n. 8 Std.
Färbung:	keine Färbung		sehr geringe blaßblaue Färbung		tiefblaue Färbung			
Wachstum auf:	Agar	Löffler	Agar	Löffler	Agar	Löffler	Agar	Agar
1. Tag	sehr stark +	sehr stark +	sehr stark +	sehr stark +	—	—	sehr stark +	sehr stark +
3. Tag	.	.	.	.	—	—	.	.
5. Tag	.	.	.	.	—	—	.	.
7. Tag	.	.	.	.	—	—	.	.

Wie sich zeigte, besitzt der Karbolstamm in der Tat gegenüber Methylenblau eine größere Widerstandsfähigkeit als sein Ausgangsstamm. Wir haben hier vor uns eine durch Züchtung auf karbolhaltigem Nährboden erworbene Resistenz gegenüber Methylenblau. Daß wir eine Festigkeit gegenüber Karbolsäure nicht nachgewiesen haben, mag daran liegen, daß die Karbolsäure ein viel stärkeres Abtötungsmittel ist als Methylenblau und daß deshalb bei der von uns angewandten Methode geringere Grade von Festigkeit nicht in Erscheinung treten, wohl aber bei einem schwachen Desinfektionsmittel. Wir neigen der Annahme zu, daß es sich bei dieser Festigkeit nicht um den Verlust von Chemozeptoren im Sinne Ehrlichs handelt, sondern um eine physikalische Zustandsänderung des Bakterienprotoplasmas, vor allem des Ektoplasmas. Wir schließen das deshalb, weil eine biochemische Veränderung des Karbolstammes gegenüber seinem Ausgangsstamm nicht nachweisbar ist und weil eine Dichtigkeitszunahme des Bakterienprotoplasmas und eine Membranverdickung mikroskopisch feststellbar ist. Mit der zuletzt erwähnten Tatsache läßt sich sowohl die schwere Entfärbbarkeit bei der Gramfärbung wie die Resistenz gegenüber Methylenblau bei intravitaler Färbung und im Abtötungsversuch erklären. Unter dem Einfluß der Karbolsäure erlangt also das Bakterium Eigenschaften, die denen einer Spore ähnlich sind. Wie bei dieser ist das Hinein- und Herausdiffundieren des Farbstoffes aus dem Zelleib erschwert und gleichzeitig eine Resistenz gegen Schädlichkeiten erworben.

Dieses Verhalten des Karbolstammes weist darauf hin, daß seine morphologische Veränderung nicht als Degenerations- oder Involutionserscheinung aufzufassen ist, denn sie stellt, wie wir sahen, eine zweckmäßige Anpassung an ungünstige Verhältnisse dar. Für die Richtigkeit des Gesagten sprechen auch die Regenerationsversuche: Der Karbolstamm wurde, nachdem er 75 Passagen auf Karbolagar gezüchtet worden war, auf einen gewöhnlichen Nähragar abgeimpft und sowohl auf seine kulturellen Eigenschaften (wie Kohlehydratspaltung, Indolbildung usw.) wie auch morphologisch untersucht. Er hat in kultureller Hinsicht keinerlei Unterschiede gegenüber seinem Ausgangsstamm gezeigt und morphologisch wies er

bereits in der ersten Abimpfung ganz die gleiche Gestalt wie der Ausgangsstamm auf und hatte mit dem Karbolstamm keinerlei Formähnlichkeit mehr. Ganz dasselbe gilt übrigens auch vom Hungerstamm.

Zusammenfassung.

Zum Schluß mögen die Ergebnisse der mitgeteilten Versuche zusammengefaßt werden:

Wird ein Colitisbazillus unter abnormen Ernährungsbedingungen gezüchtet, dann weist er gegenüber seinem Ausgangsstamm analoge morphologische Veränderungen auf, wie sie Proteus-, Typhus- und Paratyphus-Bazillen unter denselben Bedingungen zeigen. Unter der Karbolsäurewirkung bildet er Riesenfäden von mannigfaltiger Gestalt. Auf nährstoffarmem Nährboden zeichnet er sich dagegen durch besondere Kleinheit aus. Mit Hilfe der intravitalen Färbungen und mit Hilfe der Heidenhainfärbung nach vorheriger Fixation läßt sich in den Riesenformen des Karbolstammes eine Differenzierung in Kern und Protoplasma nicht durchführen. Der Karbolstamm zeigt eine wabige Innenstruktur. Ausgangs- und Hungerstamm lassen diese wabige Struktur meist vermissen. Man sieht gewöhnlich bei den letzteren das Protoplasma an den beiden Polen verdichtet. Bei der Gramfärbung fällt auf, daß der durch Hitze fixierte Karbolstamm schwerer entfärbbar ist als der Ausgangs- und Hungerstamm. Die Schnelligkeit des Eindringens von Methylenblau, Fuchsin und Viktoriablau in den lebenden Karbolstamm ist bei intravitaler Färbung gegenüber den beiden anderen Stämmen deutlich vermindert.

Desinfektionsmittel, wie Karbolsäure und Sublimat, zeigten im Hemmungs- und Abtötungsversuch gegenüber den drei Kulturformen keinerlei Unterschiede. Wohl ließ sich aber eine Verschiedenheit in der Empfindlichkeit der Stämme bei der abtötenden Wirkung des schwach wirksamen Methylenblaues feststellen. Der Karbolstamm war resistenter als die beiden anderen Kulturformen.

Bei Verwendung von gleichdichten Aufschwemmungen ließen sich unter den drei Kulturformen Unterschiede im Infektions- und Toxizitätsversuch an der Maus nicht feststelllen.

Im Gegensatz zu dem Verhalten von Proteus-, Typhus-

und Paratyphus B-Bazillen ließen sich bei dem untersuchten Colitisbazillus mit Hilfe der Agglutination antigene Veränderungen des Karbol- und Hungerstammes gegenüber dem Ausgangsstamm nicht nachweisen. Weder ein Verlust bestimmter Agglutinogene noch ein Neuerwerben andersartiger war nachweisbar. Der Colitisbazillus besitzt demnach zum Unterschied von den obengenannten Bakterienarten keine Leibesbestandteile von Agglutinogencharakter, die nicht lebensnotwendig wären. Bei Proteusbazillen und den anderen obenerwähnten Bakterienarten geht bei Unterernährung und unter der Einwirkung von Karbolsäure mit dem Verlust bestimmter Agglutinogene der ektoplasmatische Geißelapparat verloren; das zu seinem Aufbau nötige Nährmaterial wird bei ungünstigen Ernährungsbedingungen für lebensnotwendige Leibesbestandteile verwendet. Die Colitisbazillen sind geißellos. Es stehen ihnen aber keine Leibesbestandteile von Agglutinogencharakter zur Verfügung, die bei Unterernährung für den Geißelapparat vikariierend eintreten könnten. Um so naheliegender ist deshalb die Annahme, daß sich bei Proteusbazillen und anderen beweglichen Bakterienarten die unter ungünstigen Bedingungen verlorengehenden Antigene in dem ektoplasmatischen Geißelapparat befinden.

Unter dem Einfluß der Karbolsäure treten in den Eigenschaften des Colitisbazillus Veränderungen auf, die Aehnlichkeit mit denen einer Spore haben: die Bakterien sind schwerer färbbar und entfärbbar und widerstandsfähiger gegen die abtötende Wirkung des Methylenblaus. Dies ist in der größeren Protoplasmadichtigkeit des Karbolstammes und in der Membranverdickung begründet.

Die bizarren morphologischen Veränderungen, welche die Karbolstammbakterien aufweisen, sind nicht als Degenerations- und Involutionserscheinungen aufzufassen, da sie zweckmäßige Abwehrreaktionen gegen die Schädigungen darstellen. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der Regenerationsversuche: Trotz langer Züchtung auf nährstoffarmem oder Karbolsäure enthaltendem Nährboden lassen sich kulturelle Veränderungen solcher Bakterien nicht nachweisen, und die morphologischen Unterschiede gegenüber dem Ausgangsstamm verschwinden sofort, wenn normale Bedingungen eintreten.

[Aus der Psychiatrischen- und Nervenklinik der Universität in Frankfurt a. M. (Direktor: Prof. Dr. Kleist).]

Studien bei der Recurrensinfektion zwecks Beeinflussung von Psychosen.

Von **R. Weichbrodt.**

Mit 3 Kurven im Text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 1. August 1921.)

Es ist schon den alten Psychiatern bekannt gewesen, daß sich bei Paralytikern im Anschluß an akute fieberhafte Erkrankungen zuweilen weitgehende Stillstände und Besserungen (Remissionen) des Gehirnleidens einstellen können. Die neuere Literatur berichtet auch von günstiger Beeinflussung fieberhafter Erkrankungen auf sekundäre und tertiäre Syphilis. Auf diese Erfahrungen hin hat Wagner von Jauregg seit Jahren die Fiebertherapie der Paralyse empfohlen, er und seine Schüler haben diese Therapie weiter ausgebaut. Sein letzter Vorschlag, den Versuch zu machen, die Paralyse mit Malaria zu beeinflussen, ist von einigen Kliniken aufgenommen worden, und die bisherigen Erfahrungen ermuntern zu weiteren Versuchen.

Nach unserer Auffassung der Paralyse als einer eigenartigen Spirochätenerkrankung des Zentralnervensystems erschien eine Fiebertherapie der Paralyse nur dann erfolgversprechend, wenn sich ein deutlicher Einfluß des Fiebers auf den Krankheitserreger, die Spirochaeta pallida, auch experimentell nachweisen ließe. Jahnel war es seit langem aufgefallen, daß bei Paralysen, die 2—3 Tage vor dem Tode hohes Fieber gehabt hatten, fast nie Spirochäten zu finden waren. Zu der Erforschung der Wirkung hoher Temperaturen auf die Spirochäten erschien allein die experimentelle Hodensyphilis des Kaninchens geeignet. Nach vielen Vorversuchen kamen Jahnel und ich schließlich zu der Versuchsanordnung, daß wir syphilitische Kaninchen in einen Thermostaten von

ungefähr 40° Lufttemperatur für ungefähr 1/2 Stunde setzten. Nach dieser Zeit erreichen die Tiere rektale Temperaturen von 41—45°. Unmittelbar nach der Erwärmung war meist keine Schädigung der Spirochäten zu bemerken, in den meisten Fällen zeigt sich die Einwirkung der erhöhten Körpertemperatur erst nach 2 Tagen, die Spirochäten werden zuerst unbeweglich, nehmen an Zahl ab und verschwinden schließlich ganz, worauf in 3—5 Wochen der Schanker abheilt. Bei ungenügender Wärmeeinwirkung bilden sich bald Rezidive.

Ob die hohen Körpertemperaturen direkt oder indirekt die Fortpflanzung der Spirochäten schädigen, wird durch weitere experimentelle Untersuchungen zu klären gesucht. Die bisherigen Untersuchungen lassen aber schon den Schluß zu, daß wenn überhaupt, so nur durch hohe Temperaturen weitgehende Besserungen bei Paralyse zu erreichen sind. Nun reagieren aber verhältnismäßig wenige Menschen auf Infektionen mit Temperaturen über 40°. Bei den meisten bleibt die Temperatur unter 40°. Auf Grund der im Tierexperiment nachgewiesenen Wirkung stark erhöhter Körpertemperaturen auf die Syphilisspirochäten waren daher die von Wagner von Jauregg empfohlenen verschiedenen Wege der Fiebertherapie danach zu bewerten, ob sie regelmäßig hohe Temperaturen erzielen. Sicherlich ist die Malaria dadurch, daß sie häufige Fieberattacken und mitunter sehr hohes Fieber macht, für die Paralysetherapie besonders geeignet, sie hat nur den Nachteil (der in Kauf genommen werden müßte, falls kein besseres Mittel zu finden wäre), daß die Kranken dabei körperlich sehr herunter kommen. Es war daher angezeigt, sich nach anderen Möglichkeiten umzuschauen. Die Literatur weist uns u. a. auf die Recurrensinfektionen hin, die schon im Jahre 1875 von Rosenblum zu therapeutischen Zwecken bei Psychosen angewendet worden sind und die den Kranken nicht sehr mitnehmen sollen und doch sehr hohe Temperaturen verursachen. Die beiden Recurrensstämme des Georg Speyer-Hauses in Frankfurt a. M., die seit Jahren in Mäusepassagen gehalten werden, und der ebenfalls in Mäusepassagen gehaltene afrikanische Recurrensstamm, den mir Dr. Roehl aus Elberfeld freundlichst überließ, erwiesen sich für Menschen als apathogen. Nun teilten Plaut und Steiner auf der 44.

Wanderversammlung der südwestdeutschen Neurologen und Psychiater mit, daß es ihnen mit dem afrikanischen Stamm des Hamburger Tropeninstitutes gelungen wäre, Menschen zu infizieren. In liebenswürdigster Weise wurde auch mir daraufhin der Stamm von dem Hamburger Tropeninstitut überlassen.

Die therapeutischen Versuche, auf die später noch zurückzukommen sein wird, gaben mir Gelegenheit, Studien bei den Recurrensspirochäten zu machen. Wenn auch die Syphilisspirochäte ein Gewebsparasit und die Recurrensspirochäte ein Blutparasit ist, so konnte doch das Studium der Recurrensinfektion uns manchen Hinweis für das Studium der Syphilisinfektion bringen. In einer kurzen Mitteilung in der Deutschen med. Wochenschr., 1920, No. 25, sind bereits einige Befunde bekanntgegeben.

Wir infizierten gewöhnlich zu Heilzwecken die Kranken so, daß wir eine stark positive Recurrensmaus entbluteten und das so erhaltene Blut dem Kranken subkutan, in einigen Fällen auch intravenös einspritzten.

Deutliche Unterschiede zwischen subkutaner und intravenöser Darreichung waren nicht erkennbar, dagegen schien die Zahl der injizierten Spirochäten in der Inkubationszeit eine Rolle zu spielen. Wir bekamen mitunter schon nach 3 Tagen den ersten Fieberanfall, im Durchschnitt erst nach 5 Tagen, in wenigen Fällen erst nach 7 Tagen. Auch die Abstände zwischen den einzelnen Anfällen waren sehr verschieden; zwischen dem 1. und 2. Anfall lagen meist 5—7 Tage, aber auch 14 Tage kamen vor, genau so waren die Abstände zwischen dem 2. und 3. Anfall und dem 3. und 4. Anfall sehr verschieden; in 2 Fällen trat 24 bzw. 26 Tage nach dem 5. Anfall erst der 6. Anfall auf. Es scheint, soweit einige wenige Fälle einen Schluß erlauben, daß in den Fällen, die eine sehr lange Inkubationszeit haben, auch die Abstände zwischen den einzelnen Anfällen ungewöhnlich lang sind.

Was das Fieber anbetrifft, so sahen wir nur sehr selten Temperaturen um 41°, meist blieben die Temperaturen unter 40°.

Bei den Untersuchungen interessierte zuerst die Frage, wie lange Recurrensspirochäten im Blute des infizierten

Menschen nachzuweisen wären. Mit Hilfe des Dunkelfeldes gelang es meist, 10—24 Stunden vor dem 1. und 2. Anfall und im 1. und 2. Anfall sie zu finden, vor oder in dem 3. oder 4. Anfall waren sie äußerst selten nachweisbar. Besser eignet sich zum Nachweis der Spirochäten die Mäuseimpfung. In unseren Fällen zeigte es sich, daß 30—50 Tage nach der Infektion mit 1 ccm Menschenblut eine Maus noch zu infizieren war, und zwar gingen die Infektionen in 3—9 Tagen an, die Inkubationszeit bei der Maus war eben auch von der Menge der injizierten Spirochäten abhängig; waren, wie z. B. kurz vor dem Anfall, sehr viele Spirochäten im Menschenblut, so war die mit dem Blut infizierte Maus in 2—3 Tagen positiv. Auch das während des Schweißausbruches und nach dem kritischen Abfalle der Temperatur entnommene Blut erwies sich als infektiös; nur dann, wenn die Anfälle zeitig weit auseinanderlagen — z. B. 14 Tage — gelang es nicht immer, kurz nach dem Anfall mit 1 ccm Blut eine Maus zu infizieren; in diesen Fällen kreisten eben so wenige Spirochäten im Blute, daß nicht auf jede Injektion die Spirochätenmenge kam, die für eine Infektion erforderlich ist.

Wie schon erwähnt, gelang es uns nur mit dem Stamm des Hamburger Tropeninstitutes einen Menschen zu infizieren. Injizierten wir aber von dem Stamm des Georg Speyer-Hauses, der menschenapathogen ist, das Blut einer stark positiven Maus einen Menschen, so gelang es uns in mehreren Fällen 6—48 Stunden nach der Injektion mit dem Menschenblut eine Maus zu infizieren. Obwohl also der Stamm für Menschen apathogen ist, können demnach die Spirochäten bis zu 48 Stunden im Blute kreisen, ohne ihre Pathogenität für die Maus zu verlieren. Diese Befunde lassen vielleicht die Deutung zu, daß die Lebensdauer der Recurrensspirochäten ungefähr 2 Tage beträgt, was auch für die Luesspirochäten aus den Experimenten über die Einwirkung hoher Temperaturen herausgelesen werden kann. Die Menschenapathogenität der Recurrensspirochäte des Georg Speyer-Hauses scheint darauf zu beruhen, daß diese Spirochäten sich im Menschenblut nicht fortpflanzen können. Aus den Mäuseversuchen erkennen wir, daß diese apathogenen Recurrensspirochäten innerhalb 48 Stunden zurückgehen, während die pathogenen

ständig zunehmen, so daß die Inkubationszeit bei der Maus zum Anfall hin immer kleiner wird, bis eine Zeit erreicht wird, die auch durch größere Spirochätenmengen anscheinend nicht mehr verkürzt werden kann. Die folgende Tabelle gibt uns ein Bild davon. Von einem Kranken, der subkutan infiziert war, wurde täglich 1 ccm Blut entnommen und einer Maus intraperitoneal injiziert, und zwar 50 Tage lang.

Blutentnahme	6	Std.	nach	der	Injektion,	Maus	Spirochäten	nach	5	Tagen
,,	1	Tag	,,	,,	,,	,,	,,	,,	6	,,
,,	2	Tage	,,	,,	,,	,,	,,	,,	5	,,
,,	3	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	4	,,
,,	4	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	3	,,
,,	**5**	,,	1. Anfall		,,	,,	,,	,,	3	,,
,,	6	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	6	,,
,,	7	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	5	,,
,,	8	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	3	,,
,,	9	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	3	,,
,,	10	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	4	,,
,,	11	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	5	,,
,,	12	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	3	,,
,,	13	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	3	,,
,,	**14**	,,	2. Anfall		,,	,,	,,	,,	3	,,
,,	**15**	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	3	,,
,,	16	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	6	,,
,,	17	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	4	,,
,,	18	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	3	,,
,,	19	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	3	,,
,,	20	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	3	,,
,,	**21**	,,	3. Anfall		,,	,,	,,	,,	3	,,
,,	22	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	9	,,
,,	23	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	5	,,
,,	24	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	5	,,
,,	25	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	7	,,
,,	26	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	4	,,
,,	27	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	5	,,
,,	28	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	3	,,
,,	29	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	3	,,
,,	30	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	3	,,
,,	**31**	,,	4. Anfall		,,	,,	,,	,,	3	,,
,,	32	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	9	,,
,,	33	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	7	,,
,,	34	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	7	,,
,,	35	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	6	,,
,,	36	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	7	,,
,,	37	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	5	,,
,,	38	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	4	,,
,,	39	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	5	,,
,,	40	,,	,,	,,	,,	,,	,,	,,	5	,,
,,	41	,,	(Temperatur		37,4)	,,	,,	,,	3	,,
,,	42	,,	(	,,	37,8)	,,	,,	,,	3	,,
,,	43	,,	(	,,	36,5)	war nicht angegangen				
,,	44	,,				,,	,,	,,		
,,	45	,,				,,	,,	,,		
,,	46–50					,,	,,	,,		

In diesem Falle gingen alle Uebertragungen 42 Tage hintereinander an, auch Uebertragungen ganz kurz nach dem Anfall. Wir sehen an der Inkubationszeit der Maus, wie die Spirochäten zum Anfall hin zunehmen, im Anfall größtenteils zugrunde gehen, und dann wiederholt sich derselbe Vorgang von Anfall zu Anfall, bis in einem Anfatl alle Spirochäten vernichtet werden. In einem andern Falle war schon nach dem 18. Tage es nicht mehr möglich, mit dem Blut des Kranken eine Maus zu infizieren, in manchen Fällen wiederum ergaben Stichproben 39—50 Tage nach der Infektion positive Resultate.

Das Studium des Liquors konnte natürlich bei denselben Kranken nicht täglich durchgeführt werden, hier mußten die Untersuchungen an verschiedenen Kranken so eingerichtet werden, daß die Summe der Untersuchungen ein ungefähres Bild des Ablaufs der Recurrensinfektion im Liquor ergaben. Wir waren bei unseren Kranken so vorgegangen, daß wir sie durchschnittlich alle 8 Tage punktierten und sofort 2 Mäusen je 1 ccm Liquor intraperitoneal injizierten. In jedem Falle wurde zu gleicher Zeit Blut von den Kranken entnommen und Mäusen injiziert. Daß der Liquor von Recurrenskranken pathologisch verändert ist und auch infektiös sein kann, ist bekannt (s. Plaut und Steiner, die sich in letzter Zeit sehr eingehend mit den Liquorveränderungen der Recurrenskranken befaßt haben, sowie die Ergänzungen dieser Literaturangaben von Martin Mayer und Zeiß). Aus letzter Zeit wäre noch die Arbeit von Nitzescu zu erwähnen, der im Jahre 1917 und 1918 je 2 ccm Liquor von Recurrenskranken auf 8 Personen subkutan übertrug, von denen 5 an Recurrens erkrankten; die 3 Fälle, bei denen die Infektion nicht angegangen war, hatten einige Zeit vorher Recurrens durchgemacht. Nitzescu erwähnt dabei, daß derartige Versuche schon vor ihm von Combiescu gemacht worden waren.

Was nun die Liquorveränderungen betrifft, so konnten wir, wie Plaut und Steiner, in fast allen Fällen eine starke Zunahme der Lymphozyten feststellen, auch eine Zunahme der Eiweißreaktionen war fast stets zu erkennen. An infizierten Katatonen zeigte es sich, daß die Eiweißreaktionen später als die Lymphozytose auftraten. In einem Falle waren

bei einem Katatonen trotz des Nachweises von Spirochäten keine pathologischen Liquorveränderungen. Mit Hilfe des Dunkelfeldes im Liquor Spirochäten nachzuweisen, gelang uns nie, nur durch Mäuseimpfung. Der Liquor erwies sich im allgemeinen 2—3 Tage nach dem ersten Anfall als infektiös, in einem Fall konnten wir auch mit dem Liquor aus dem ersten Anfall eine Maus infizieren. Sind die Recurrensspirochäten erst im Liquor, so scheinen sie nicht mehr in dem Maße wie die Spirochäten im Blute von den Fieberanfällen abhängig zu sein, so wurden mitunter Mäuse mit den 1—2 Tage nach einem Anfall entnommenen Liquormengen in 2—3 Tagen infiziert, während mit den zu gleicher Zeit entnommenen Blutmengen die Infektion erst nach 6—9 Tagen anging. Auch in den Fällen, wo eine Infektion nach einem Fieberanfall überhaupt nicht anging, ging die mit dem zu gleicher Zeit entnommenen Liquor infizierte Maus in 3 Tagen an. Daß aber die Spirochäten sich noch im Liquor aufhalten können, während sie aus dem Blut schon völlig verschwunden sind, so daß es zu keinem Anfall mehr kommt, was Plaut und Steiner an ihren Fällen gefunden haben, ließ sich an unseren Fällen nicht mit Sicherheit bestimmen. Plaut und Steiner meinen, es bestände auch die Möglichkeit einer Reinfektion des Blutes vom Subarachnoidealraum aus, so hätten in einem Falle zwischen 2 Anfällen 41 Tage gelegen, in der Zwischenzeit wäre wohl der Liquor, aber nicht das Blut infektiös gewesen. Nun ist ja ohne weiteres zuzugeben, daß auch vom Liquor aus eine Infektion möglich ist, und wir haben sogar in 2 Fällen Paralytiker durch intralumbale Injektionen — wir injizierten Blut (in Zukunft soll Liquor genommen werden) von Recurrenskranken — infiziert. In beiden Fällen bekamen wir nach 6 bzw. 7 Tagen den ersten Anfall mit Spirochäten im Blut. Für das Intervall von 41 Tagen erscheint mir aber die Erklärung wahrscheinlicher, daß infolge der Immunitätsvorgänge im Blute die nach dem letzten Anfall im Blut zurückgebliebenen Spirochäten so danieder gehalten wurden, daß erst Rezidivstämme, gegen die noch keine Abwehrstoffe im Blut gebildet worden waren, sich dann so vermehren konnten, daß ein neuer Anfall ausgelöst wurde. Damit kommen wir auch auf die Frage der Rezidivstämme. Wir

haben festzustellen gesucht, ob zwischen den Spirochäten der einzelnen Anfälle biologische Unterschiede nachzuweisen wären, ob eine Maus, die mit Spirochäten des 1. oder 2. Anfalles infiziert war, noch mit Spirochäten des 2. oder 3. Anfalles zu infizieren wäre. Bei unserer Versuchsanordnung hatten wir nie positive Resultute. Kudicke hat aber mit Feldt festgestellt, daß auch die Recurrensspirochäten Rezidivstämme bilden, in vielen Fällen bilden sie sich aber rasch zu den Ausgangsstämmen zurück, so daß, wie die beiden Autoren meinen, unsere negativen Befunde damit zu erklären wären.

Wir suchten ferner festzustellen, ob Menschen, die eine Recurrensinfektion überstanden hatten, nach längerer Zeit zu reinfizieren wären. In keinem Falle — es handelte sich um Zeitdifferenzen bis zu 18 Monaten — gelang es uns, eine Reinfektion zu erzielen. Wir konnten auch nicht die ersten beiden Tage nach der Injektion mit dem Menschenblute Mäuse infizieren, die Spirochäten waren also sofort aus dem Blute verschwunden. Dieselben Erfahrungen machten wir mit dem Stamm des Georg Speyer-Hauses; injizierten wir unseren Patienten, die Recurrens überstanden hatten, selbst sehr große Mengen dieses Mäuseblutes, so konnten wir nachher mit dem Menschenblut zu keiner Zeit eine Maus infizieren, was uns ja, wie gezeigt, manchmal gelang, wenn die Kranken noch nicht Recurrens durchgemacht hatten. Es sei aber hier gleich hervorgehoben, daß es nie gelang, auch nicht durch mehrfache Injektionen mit dem Stamm des Georg Speyer-Hauses Menschen gegen den Hamburger Stamm immun zu machen, es kam auch nicht etwa danach zu einer verspäteten Infektion. Mäuse dagegen, die mit dem Hamburger Stamm infiziert waren, und die Infektion überstanden hatten, waren nicht mit dem Stamm des Georg Speyer-Hauses zu reinfizieren, und umgekehrt, während diese Mäuse nach überstandener Infektion mit dem Elberfelder Stamm, angingen und umgekehrt.

Es war weiter zu untersuchen, wie sich Blut und Liquor hinsichtlich der Immunität verhielten. Plaut und Steiner behaupten, daß wirkliche Immunitätsreaktionen weder mit dem Serum noch mit dem Liquor der mit Recurrens geimpften und erkrankten Fälle nachweisbar wären. Wir waren bei unseren Untersuchungen folgendermaßen vorgegangen:

Nach Ablauf der Erkrankung wurden Blut und Liquor zu verschiedenen Malen entnommen. Bei den ersten Versuchen setzten wir zu 1 ccm Serum oder Liquor 0,1 ccm unverdünntes Mäuseblut einer stark positiven Maus. Später verdünnten wir das Mäuseblut mit Aqua dest. im Verhältnis 1 : 10 und gaben von dieser Lösung 0,1 ccm zu 1 ccm Serum oder Liquor, bzw. verdünntem Serum und Liquor. Die Verdünnungen des Serums (1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 10, 1 : 20) und des Liquors (1 : 2, 1 : 4, 1 : 5) wurden ebenfalls mit Aqua dest. hergestellt. Zu den Versuchen benutzten wir den Stamm des Hamburger Tropeninstituts (Hamburger Stamm), des Georg Speyer-Hauses in Frankfurt a. M. (Frankfurter Stamm), und den Stamm von Herrn Dr. Röhl aus Elberfeld (Elberfelder Stamm). Bei den Kontrolluntersuchungen wurde teilweise normales Menschenserum, teilweise Aqua dest. genommen. Die Mischungen wurden zum Teil sofort, zum Teil nach 1 Stunde Mäusen intraperitoneal injiziert, wesentliche Unterschiede ergaben sich bei diesen beiden Methoden nicht. Die Mäuse wurden täglich untersucht. Um es gleich vorwegzunehmen, haben zahlreiche Versuche mit normalem Menschenserum gezeigt, daß durch das normale Serum die Infektion weder verzögert noch verhindert wird.

Fall 1 wurde am 27. X. 1919 subkutan infiziert, 42 Tage lang wurden, wie das Protokoll vorher zeigt, in seinem Blute durch Mäuseimpfung Spirochäten nachgewiesen.

Am 29. XII. 1919 erster Versuch.

0,1 ccm unverdünntes Mäuseblut (Hamburger Stamm) zu

a) 1 ccm Serum (sofort infiziert)	b) 1 ccm Serum (nach 1 Std. injiziert)
21 Tage Spirochäten 0.	21 Tage Spirochäten 0.

c) 1 ccm Liquor (sofort injiziert)	d) 1 ccm Liquor (nach 1 Std. injiziert)
7 Tage Spirochäten 0.	8 Tage Spirochäten 0.
8. Tag „ +.	9. Tag „ +.

Die Kontrolle mit normalem Serum und mit Aqua dest. war nach 3 Tagen positiv. Dieselben Versuche wurden mit dem Elberfelder Stamm gemacht, dabei gingen alle Versuche genau so schnell an, wie die Kontrollen.

15. III. 1920 2. Versuch.

0,1 ccm verdünntes Mäuseblut (Hamburger Stamm) zu

a) 1 ccm Serum.	b) 1 ccm 1:2 Serum.	c) 1 ccm 1:4 Serum.
21 Tage Spir. 0.	21 Tage Spir. 0.	12 Tage Spir. 0.
		13. Tag „ +.

d) 1 ccm 1:8 Serum.	e) 1 ccm 1:10 Serum.	f) 1 ccm 1:20 Serum.
5 Tage Spir. 0.	2 Tage Spir. 0.	2 Tage Spir. 0.
6. Tag „ +.	3. Tag „ +.	3. Tag „ +.
g) 1 ccm Liquor.	h) 1 ccm 1:2 Liquor.	i) 1 ccm 1:4 Liquor
21 Tage Spir. 0.	11 Tage Spir. 0.	3 Tage Spir. 0.
	12. Tag „ +.	4. Tag „ +.
k) 1 ccm 1:5 Liquor.	l) Kontrolle.	
2 Tage Spir. 0.	2 Tage Spir. 0.	
3. Tag „ +.	3. Tag „ +.	

Bei diesem Versuch wurden die Mischungen nach 1 Stunde injiziert; derselbe Versuch wurde auch mit dem Frankfurter Stamm gemacht; um Raum zu sparen, seien nur die abweichenden Ergebnisse angegeben.

Im Versuch c) und e) war die Maus am 3. Tage tot, ohne daß Spirochäten nachzuweisen waren; im Versuch g) hatte 1 ccm Liquor die Infektion nicht verhindert, sondern nur verzögert, am 13. Tage waren Spirochäten nachzuweisen.

Am 23. V. 1920 wurde der 3. Versuch angestellt und ähnliche Befunde wie im 2. Versuch erhoben.

Am 16. VII. 1920 4. Versuch.

0,1 ccm verdünntes Mäuseblut (Hamburger Stamm) zu

a) 1 ccm Serum.	b) 1 ccm 1:2 Serum.	c) 1 ccm 1:4 Serum.
12 Tage Spir. 0.	21 Tage Spir. 0.	9 Tage Spir. 0.
13. Tag Maus tot.		10. Tag „ +.
d) 1 ccm 1:8 Serum.	e) 1 ccm 1:10 Serum.	f) 1 ccm 1:20 Serum.
4 Tage Spir. 0.	nach 1 Tag Maus tot.	2 Tage Spir. 0.
5. Tag „ +.		3. Tag „ +.
g) 1 ccm Liquor.	h) 1 ccm 1:2 Liquor.	i) 1 ccm 1:4 Liquor.
9 Tage Spir. 0.	1 Tag Spir. 0.	2 Tage Spir. 0.
10. Tag „ +.	2. Tag Maus tot.	3. Tag „ +
k) 1 ccm 1:5 Liquor.	l) Kontrolle.	
2 Tage Spir. 0.	2 Tage Spir. 0.	
3. Tag „ +.	3. Tag „ +.	

Auch hier wurden Injektionen nach 1 Stunde gemacht, auch hier ergab der Versuch mit dem Frankfurter Stamm keine wesentlich abweichenden Resultate.

Fall 2 wurde am 14. XI. 1919 subkutan infiziert, am 6. I. 1920 war der 6. Anfall.

Am 29. I. 1920 1. Versuch.

0,1 ccm unverdünntes Mäuseblut (Hamburger Stamm) zu

a) 1 ccm Serum.	b) 1 ccm 1:2 Serum.	c) 1 ccm 1:4 Serum.
nach 1 Tag Maus tot.	nach 2 Tagen Maus tot.	5 Tage Spir. 0.
		6. Tag „ +.

d) 1 ccm 1:8 Serum. e) 1 ccm 1:10 Serum. f) 1 ccm 1:20 Serum.
4 Tage Spir. 0. 3 Tage Spir. 0. 2 Tage Spir. 0.
5. Tag „ +. 4. Tag „ +. 3. Tag „ +.

g) 1 ccm Liquor. h) 1 ccm 1:2 Liquor. i) 1 ccm 1:4 Liquor.
8 Tage Spir. 0. 4 Tage Spir. 0. 2 Tage Spir. 0.
9. Tag „ +. 5. Tag „ +. 3. Tag „ +.

k) 1 ccm 1:5 Liquor. l) Kontrolle.
2 Tage Spir. 0. 2 Tage Spir. 0.
3. Tag „ +. 3. Tag „ +.

Die Mischungen wurden nach 1 Stunde injiziert, die Versuche mit dem Frankfurter Stamm ergaben ähnliche Resultate.

1. IV. 1920 2. Versuch.
0,1 ccm verdünntes Mäuseblut (Hamburger Stamm) zu

a) 1 ccm Serum. b) 1 ccm 1:2 Serum. c) 1 ccm 1:4 Serum.
2. Tag Maus tot. 8 Tage Spir. 0. 8 Tage Spir. 0.
9. Tag „ +. 9. Tag „ +.

d) 1 ccm 1:8 Serum. e) 1 ccm 1:10 Serum. f) 1 ccm 1:20 Serum.
5 Tage Spir. 0. 3 Tage Spir. 0. 3 Tage Spir. 0.
6. Tag „ +. 4. Tag „ +. 4. Tag „ +.

g) 1 ccm Liquor. h) 1 ccm 1:2 Liquor. i) 1 ccm 1:4 Liquor.
9 Tage Spir. 0. 6 Tage Spir. 0. 4 Tage Spir. 0.
10. Tag „ +. 7. Tag „ +. 5. Tag „ +.

k) 1 ccm 1:5 Liquor. l) Kontrolle.
3 Tage Spir. 0. 3 Tage Spir. 0.
4. Tag „ +. 4. Tag „ +.

Fall 3. Am 6. I. 1920 subkutan infiziert, am 11. I. war der 1. Anfall, am 14. II. der 4. Anfall.

Am 13. III. 1920 erster Versuch.

a) 1 ccm Serum. b) 1 ccm 1:2 Serum. c) 1 ccm 1:4 Serum.
21 Tage Spir. 0. 16 Tage Spir. 0. 9 Tage Spir. 0.
17. Tag Maus tot. 10. Tag „ +.

d) 1 ccm 1:8 Serum e) 1 ccm 1:10 Serum. f) 1 ccm 1:20 Serum.
9 Tage Spir. 0. 6 Tage Spir. 0. 3 Tage Spir. 0.
10. Tag „ +. 7. Tag „ +. 4. Tag „ +.

g) 1 ccm Liquor. h) 1 ccm 1:2 Liquor. i) 1 ccm 1:4 Liquor.
21 Tage Spir. 0. 10 Tage Spir. 0. 5 Tage Spir. 0.
11. Tag „ +. 6. Tag „ +.

k) 1 ccm 1:5 Liquor. l) Kontrolle.
5 Tage Spir. 0. 2 Tage Spir. 0.
6. Tag „ +. 3. Tag „ +.

Die Mischungen wurden nach 1 Stunde injiziert, auch hier wurden mit dem Frankfurter Stamm ähnliche Befunde erhoben, nur waren im

Versuch g) am 10. Tage und im Versuch h) am 6. Tage Spirochäten nachzuweisen.

Am 3. VI. 1920 ergab der 2. Versuch ähnliche Befunde wie der 1.

Fall 4 wurde am 16. VIII. 1920 intralumbal injiziert, erst am 4. Tage konnte mit dem Blut des Kranken eine Maus infiziert werden, am 7. Tage, am 23. VIII., trat der erste Anfall auf, am 21. IX. der 4. Anfall.

Am 7. XI. 1920 1. Versuch.

0,1 ccm verdünntes Mäuseblut (Hamburger Stamm) zu

a) 1 ccm Serum. 10 Tage Spir. 0. 11. Tag „ +.	b) 1 ccm 1:2 Serum. 8 Tage Spir. 0. 9. Tag „ +.	c) 1 ccm 1:4 Serum. 2. Tag Maus tot.
d) 1 ccm 1:8 Serum. 4 Tage Spir. 0. 5. Tag „ +.	e) 1 ccm 1:10 Serum. 4 Tage Spir. 0. 5. Tag „ +.	f) 1 ccm 1:20 Serum. 2 Tage Spir. 0. 3. Tag „ +.
g) 1 ccm Liquor. 21 Tage Spir. 0.	h) 1 ccm 1:2 Liquor. 21 Tage Spir. 0.	i) 1 ccm 1:4 Liquor. 9 Tage Spir. 0. 10. Tag „ +.
k) 1 ccm 1:5 Liquor. 5 Tage Spir. 0. 6. Tag „ +.	l) Kontrolle. 2 Tage Spir. 0. 3. Tag „ +.	

Am 5. V. 1921 4. Versuch.

0,1 ccm verdünntes Mäuseblut (Hamburger Stamm) zu

a) 1 ccm Serum. 10 Tage Spir. 0. 11. Tag „ +.	b) 1 ccm 1:2 Serum. 11 Tage Spir. 0. 12. Tag „ +.	c) 1 ccm 1:4 Serum. 5 Tage Spir. 0. 6. Tag „ +.
d) 1 ccm 1:8 Serum. 5 Tage Spir. 0. 6. Tag „ +.	e) 1 ccm 1:10 Serum. 4 Tage Spir. 0. 5. Tag „ +.	f) 1 ccm 1:20 Serum. 2 Tage Spir. 0. 3. Tag „ +.
g) 1 ccm Liquor. 21 Tage Spir. 0.	h) 1 ccm 1:2 Liquor. 21 Tage Spir. 0.	i) 1 ccm 1:4 Liquor. 10 Tage Spir. 0. 11. Tag „ +.
k) 1 ccm 1:5 Liquor. 7 Tage Spir. 0. 8. Tag „ +.	l) Kontrolle. 2 Tage Spir. 0. 3. Tag „ +.	

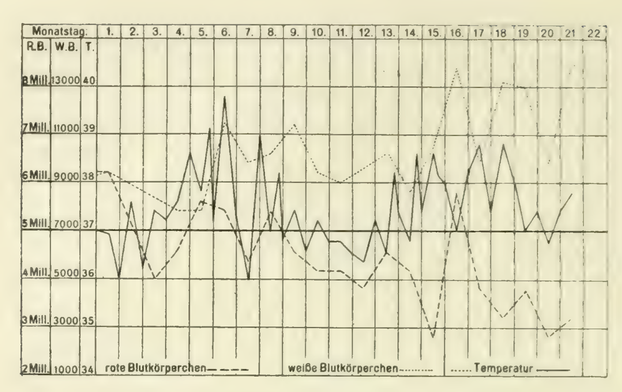
Die Mischungen wurden nach 1 Stunde injiziert; der 2. und 3. Versuch, der der Raumersparnis wegen nicht mitgeteilt ist, verlief ähnlich.

Es wurde auch 0,1 ccm verdünntes Mäuseblut mit 1 ccm Serum von Menschen, die Recurrens überstanden hatten, gemischt Paralytikern injiziert, ohne eine Infektion zu erreichen, während bei diesen Kranken später durch 0,1 ccm verdünntes Mäuseblut mit normalem Serum gemischt, eine Infektion zu erzielen war.

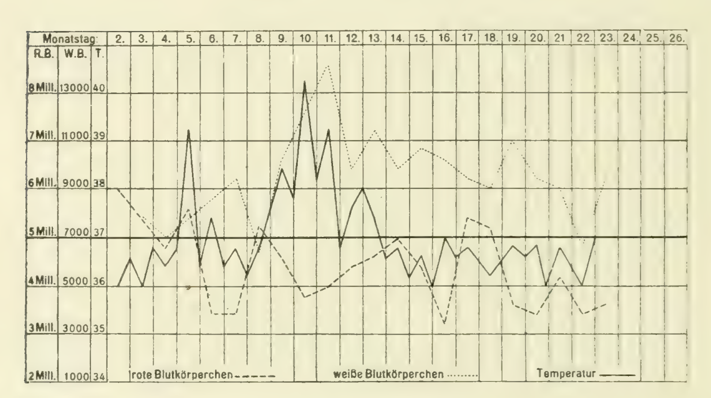
Wir haben hier nur einige Beispiele angeführt, aber diese Beispiele zeigen deutlich, daß Blut und Liquor von Patienten,

die Recurrens überstanden haben, die Infektion verhindern oder verzögern können. Der Schutz, den das Blut und der Liquor verschiedenen Kranken geben, ist verschieden, und in fast allen Fällen gibt das Serum einen stärkeren Schutz als der Liquor, nur in einem Falle, wo der Kranke intralumbal infiziert worden war, gab der Liquor einen stärkeren Schutz als das Serum. Ob dieser Befund Zufall oder durch die Art der Infektion bedingt ist, läßt sich an einem Falle nicht entscheiden, es wird aber bei weiteren Untersuchungen darauf besonders geachtet werden. Wenn nun Plaut und Steiner wirkliche Immunitätsreaktionen weder mit dem Blut noch mit dem Serum ihrer Kranken nachweisen konnten, so könnte man unter Umständen daran denken, daß ihre Resultate mit der Salvarsantherapie in irgendeinem Zusammenhange stehen, denn die Fälle von Plaut und Steiner sind im Gegensatz zu unseren Fällen mit Salvarsan behandelt worden. Sollte diese Annahme berechtigt sein, so wäre es von weittragendster Bedeutung für die ganze Salvarsantherapie; es sind daher eingehende experimentelle Untersuchungen notwendig, ob durch eine Salvarsantherapie die Immunitätsvorgänge beeinflußt werden.

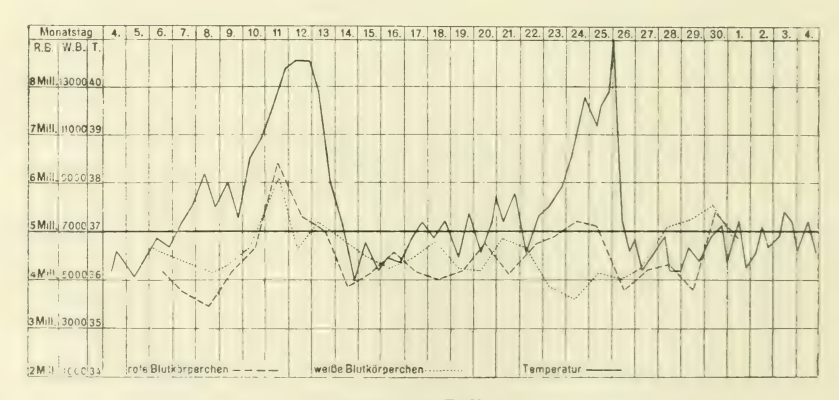
Unsere Versuche, mit Recurrensinfektion die Paralyse zu beeinflussen, liegen noch nicht lang genug zurück, um ein Urteil über den Wert dieser Behandlungsart abgeben zu können. Wir sahen wohl hier und dort gute Remissionen, wir konnten auch in mehreren Fällen eine Beeinflussung der WaR. im Blut und Liquor feststellen, aber in manchen Fällen war nicht der geringste Einfluß zu erkennen. In den meisten Fällen gelingt es eben nicht, mit der Recurrensinfektion Temperaturen über 41° zu erzielen. Bevor wir daher andere Möglichkeiten gefunden haben, hohes Fieber zu erzeugen, werden wir gut daran tun, wie Plaut und Steiner vorgeschlagen, neben der Fiebertherapie auch eine energische Salvarsankur bei der Paralyse einzuleiten. Daß man durch eine energische, meinethalben „forzierte“ Salvarsankur eine Paralyse unter Umständen günstig beeinflussen kann, habe ich früher gezeigt, und daß durch eine Fiebertherapie die Wirkung des Salvarsans erhöht werden kann, betont, worauf ich an anderer Stelle schon hingewiesen habe, schon Kyrle, und Strassberg



Kurve 1. Fall 5.



Kurve 2. Fall 6.



Kurve 3. Fall 7.

hat erst unlängst wieder darauf hingewiesen, wie bei einer Grippe durch geringe Salvarsandosen eine Lues günstig zu beeinflussen ist.

Nun suchen ja andere Autoren die günstige Wirkung der Fiebertherapie mit der Hyperleukocytose zu erklären. Ich habe schon an anderer Stelle daran erinnert, daß Löwy und Richter durch Tierexperimente bewiesen haben, daß die Hyperleukocytose nur dann wirke, wenn sie im Moment der Bakterien- und Toxinwirkung schon voll entwickelt wäre. Wir haben auch in einigen Fällen täglich die Blutbefunde bei Paralytikern, die mit Recurrens geimpft waren, erhoben; 3 Kurven seien hier wiedergegeben.

Während wir im Fall 5 und 6 nicht den geringsten Einfluß der Recurrensinfektion feststellen konnten, wurde im Fall 7 die WaR. im Blut und Liquor negativ, und es war eine deutliche Besserung festzustellen. Nun soll die Erfolglosigkeit in Fall 5 und 6 nicht ohne weiteres als Beweis gegen die Annahme angeführt werden, daß die Hyperleukocytose die Besserung bewirke, aber der Fall 7 zeigt doch, daß auch ohne Hyperleukocytose durch hohe Temperaturen weitgehende Besserungen erzielt werden können.

Zusammenfassung.

1) Ueberimpfen wir das Blut von Recurrenskranken auf Mäuse, so läßt sich zeigen, daß die Spirochäten während der ganzen Krankheit im Blut des Menschen kreisen, auch gleich nach dem Anfall sind sie fast immer nachzuweisen; liegen die Anfälle weit auseinander, so sind sie mitunter nicht nachzuweisen.

2) Impft man Menschen mit dem Stamm des Georg Speyer-Hauses, der für Menschen apathogen ist, so kann man mitunter bis zu 2 Tagen nach der Injektion mit dem Menschenblut bei einer Maus eine Infektion erzielen.

3) Reinfektionen gelangen bis zu 18 Monaten nach der ersten Infektion nicht.

4) Im Liquor waren meist 2 bis 3 Tage nach dem ersten Anfall Spirochäten nachzuweisen, nie mit Hilfe des Dunkelfelds, nur durch Ueberimpfen auf Mäuse. Die Spirochäten

im Liquor scheinen nicht in dem Maße wie die Spirochäten im Blute von den Anfällen abhängig zu sein, denn entnimmt man Blut und Liquor kurz nach dem Anfall, so ist mitunter die mit dem Blut geimpfte Maus erst nach 9 Tagen positiv, während die mit dem Liquor geimpfte schon nach 2—3 Tagen.

5) Blut und Liquor von Kranken, die eine Recurrensinfektion überstanden haben, vermögen bei einer Maus eine Infektion zu verhindern oder zu verzögern. Meist gibt das Serum einen stärkeren Schutz als der Liquor. Ob nach intralumbaler Infektion der Liquor, wie in einem Falle, einen stärkeren Schutz gibt als das Serum, muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

6) Nicht bei jeder Recurrenserkrankung sehen wir eine deutliche Hyperleukocytose; und doch sahen wir bei einem solchen Kranken eine starke günstige Beeinflussung der Krankheit.

Literatur.

Kudicke und Feldt, Arbeiten aus dem Staatsinstitut f. experimentelle Therapie und dem Georg Speyer-Hause, Frankfurt a. M., Heft 12.

Nitzescu, Comptes rendus des séances de la Soc. de Biol., 1921, T. 84, p. 1037.

Plaut und Steiner, Zeitschr. f. d. ges. Neurologie u. Psych., Bd. 53, 1919; Archiv f. Schiffs- u. Tropenhyg., Bd. 24, 1920; Deutsche med. Wochenschr., 1920, No. 40.

Weichbrodt, Deutsche med. Wochenschr., 1919, No. 13; Archiv f. Psych., Bd. 61; Deutsche med. Wochenschr., 1920, No. 25.

Weichbrodt und Jahnel, Deutsche med. Wochenschr., 1919, No. 18.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Freiburg i. B.
(Direktor: Geh. Rat Hahn).]

Die agglutinationsfördernde Wirkung des Normalserums in ihren Beziehungen zur Hämagglutination und Hämolyse.

I.

Von Privatdozent Dr. **Otto Olsen.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 7. August 1921.)

Versetzt man, wie es zum Zwecke der „Persensibilisierung“ von roten Blutkörperchen gelegentlich geschieht, Hammelblutkörperchen, die einen Zusatz eines homologen Immunserums enthalten, der allein nicht mehr agglutiniernd wirkt, mit dem durch Kohlensäurefällung von Meerschweinchenserum gewonnenen und mit Kochsalzlösung wieder verdünnten Sediment in einer Konzentration, die wiederum allein Hammelblutkörperchen nicht zusammenballt, so kann man fast stets nach kurzer Zeit eine starke Zusammenballung, Verklumpung und rasche Sedimentierung der Blutkörperchen auftreten sehen. Bei Berücksichtigung der quantitativen Verhältnisse dieses Vorgangs (Tabelle III, IV) beobachtet man bei Zusatz gleicher allein nicht agglutinierender Mengen des CO_2-Sediments zu fallenden Mengen des homologen Immunserums nicht nur eine stärkere Zusammenballung und größere Senkungsgeschwindigkeit der Blutkörperchen in den Verdünnungen des Immunserums, die schon allein zusammenballend wirken, sondern man sieht auch eine deutliche Agglutination in solchen Dosen des Immunserums auftreten, die allein nicht mehr agglutinieren. Es erfolgt mit anderen Worten eine Förderung der Agglutination durch das CO_2-Sediment des Normalserums, die sich vor allem auch in einer Erhöhung des Agglutinationstiters äußert. Diese agglutinationsfördernde Wir-

kung wird, wie aus Versuchen mit gleichen nicht mehr allein agglutinierenden Mengen Immunserums und steigenden Verdünnungen des Sediments hervorgeht, noch von geringen Konzentrationen (in Tabelle IV: 0,01) des Sediments ausgeübt. Diejenige Konzentration des Sediments, die eben noch eine Agglutination hervorzurufen vermag, ist desto geringer, je mehr sich der Verdünnungsgrad des gleichzeitig zugesetzten Immunserums den noch ohne Zusatz von Sediment agglutinierenden Konzentrationen nähert, und umgekehrt desto größer, je mehr die Verdünnung des Immunserums fortschreitet. Anscheinend handelt es sich um dieselbe agglutinationsfördernde Wirkung des Komplements und des CO_2-Sediments, die für die Bakterienagglutination durch die Untersuchungen unter anderen von Bail, Bayer[1]) schon bekannt ist und die möglicherweise ausgeübt wird durch dieselben ausflockungsfördernden Eigenschaften der Globulinfraktion, wie sie bereits[2]) Gengou beschrieben hat.

Eine derartige Förderung der Hämagglutination durch das CO_2-Sediment des Normalserums erfolgte nicht nur bei der Anwendung von Immunserum, sondern sie trat auch ein mit Normalagglutinine enthaltendem Normalserum. So wurde beispielsweise die Agglutination von Kaninchenblutkörperchen durch normales Hammelserum gefördert von normalem Meerschweinchenserum oder dessen CO_2-Sediment (Tabelle I). Ebenso machte sich die fördernde Wirkung nicht nur auch heterologe Blutkörperchen bemerkbar, sondern sie erstreckte sich auch auf homologe Blutkörperchen und auf solche des gleichen Tieres. Z. B. vermochte (Tabelle II) das normale Serum eines Hammels die Agglutination der eigenen, mit Immunserum beladenen Blutkörperchen zu fördern. Wir können also bisher agglutinationsfördernde Wirkungen des Normalserums auf homologe, heterologe Blutkörperchen und solche des gleichen Tieres bei Zusatz von Immunserum oder solchen Normalsera, die sich durch ihren Gehalt an Normalagglutininen auszeichnen, unterscheiden.

1) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 15, 1912, p. 220.
2) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 11, 1911.

Tabelle I.

Agglutination von 0,5 ccm Kaninchenblutkörperchen (5-proz.) durch fallende Mengen $^1/_2$ Stunde bei 56° erhitzten Hammelserums a) ohne, b) mit Zusatz von Meerschweinchen-CO_2-Sediment[1]) (0,05); Gesamtvolumen 2,5 ccm, Ablesung nach 18 Stunden Zimmertemperatur.

Fallende Mengen Hammelserum	a.	b.
0,1	+++	+++
0,06	+++	+++
0,04	+++	+++
0,02	++	+++
0,01	+	+++
0,006	+	+++
0,004	+	+++
0,002	—	+++
0,001	—	+++
0,0006	—	++
0,0004	—	++
0,0002	—	—
0,0001	—	—
0		

Tabelle II.

Agglutination von 0,5 ccm Hammelblutkörperchen (5-proz.) a) mit, b) ohne Zusatz von homologem Kaninchenimmunserum (Aggl.-Titer: 1:250, hämolyt. Titer: 1:800, zugesetzte Menge: 1:500) und fallenden Mengen Hammelserums (vom gleichen Tier); Gesamtvolumen 2,5 ccm, Ablesung nach 18 Stunden Zimmertemperatur.

Fallende Mengen Hammelserum	a) mit	b) ohne Immunserum
1,0	+++	—
0,6	+++	—
0,4	+++	—
0,2	+++	—
0,1	+++	—
0,06	+++	—
0,04	+++	—
0,02	+++	—
0,01	++	—
0,006	+	—
0,004	+	—
0,002	—	—
0,001	—	—
0	—	—

1) Die Spaltung des Komplements in die mittelstückhaltige Globulinfraktion (Sediment) und den endstückhaltigen Albuminteil (Abguß) geschah in sämtlichen Versuchen nach der Methode von Liefmann (Münch. med. Wochenschr., 1909, No. 41). Je 1 ccm frisches Meerschweinchenserum wird mit destilliertem Wasser (1:5) verdünnt und reine Kohlensäure im langsamen Strom etwa 5 Minuten hindurchgeleitet. Dann wird zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit (Abguß, Albuminteil, das End-

Eine weitere Analyse der Erscheinung versprach Aufschlüsse nicht nur über die Eigenschaften der den Vorgang auslösenden Faktoren, sondern auch über die Beziehungen der Hämagglutination zur Hämolyse, die bisher nur unvollkommen geklärt sind.

Beziehungen zum Mittelstück, Endstück und zur 3. Komponente des Komplements.

Es bedurfte zunächst der Feststellung von Zusammenhängen zwischen agglutinationsförderndem Prinzip und den Komponenten des Normalserums, die zur Hämolyse sensibilisierter Blutkörperchen dienen können, also des hämolytischen Komplements, um später Beziehungen zum hämolytischen Vorgang selbst aufklären zu können. Vor allem war also zu entscheiden, ob das agglutinationsfördernde Agens in seinen Eigenschaften mit solchen des Mittelstücks, Endstücks und der 3. Komponente, den bisher bekannten Komponenten des Komplements, Uebereinstimmung zeigte.

Der Uebertritt des agglutinationsfördernden Agens in das Sediment bei der Kohlensäurefällung ist aus den in Tabelle III und IV angeführten Versuchen ersichtlich. Ebenso ergibt sich aus Tabelle III die Unwirksamkeit des Abgusses, die

Tabelle III.

A Hämolyse und B Agglutination von 0,5 ccm Hammelblutkörperchen (5-proz.) durch fallende Mengen Kaninchenimmunserum. Gesamtvolumen 2,5 ccm, Ablesung nach 18 Stunden Zimmertemperatur.

Fallende Mengen Immunserum	A + frisches Meerschw.-Serum 1/5 0,5	B 1. ohne Zusatz	2. + CO_2-Sediment 1/5 0,5	3. + CO_2-Abguß 1/5 0,5
1:100	fk	+++	+++	++
1:200	k	+++	+++	++
1:400	k	+	+++	—
1:800	k	+	+++	—
1:1600	w	—	++	.
1:3200	Sp	—	+	.
1:6400	g	—	+	.
1:12000	0	—	—	.
0	0	—	—	—

stück enthaltend) abgegossen, mit 10-proz. NaCl-Lösung auf einen NaCl-Gehalt von 0,85 Proz. gebracht und das Sediment (mittelstückhaltiger Globulinteil) mit der dem ursprünglichen Serumvolumen entsprechenden Menge (1/1) Kochsalzlösung 0,85-proz. kurz vor der Verwendung gelöst.

Tabelle IV.

Agglutination von 0,5 ccm Hammelblutkörperchen 5-proz. durch fallende Mengen des CO_2-Sediments (Gesamtvolumen 2,5 ccm, Ablesung nach 18 Stunden Zimmertemperatur).

Fallende Mengen des CO_2-Sediments	I. ohne Zusatz von Immunserum	II. mit Zusatz von Immunserum in allein nicht agglutinierender Dosis (1 : 1500 0,5) hämolyt. Titer 1 : 800 agglutin. Titer 1 : 800
1,0	+	+++
0,6	—	+++
0,4	—	+++
0,2	—	+++
0,1	—	+++
0,06	—	+++
0,04	—	+++
0,02	—	++
0,01	—	+
0		—

keinerlei agglutinationsfördernde Eigenschaften zeigte. Beziehungen zwischen den im Abguß enthaltenen Komponenten des Komplements, dem Endstück, konnten also damit ausgeschlossen werden [vgl. Bayer[1])].

Bezeichnen wir als Mittelstück diejenigen Bestandteile des durch Säurefällung oder Dialyse gewonnenen Sediments des Meerschweinchenserums, die zur Hämolyse (oder Bakteriolyse) nötig sind, so waren nunmehr Zusammenhänge des agglutinationsfördernden Agens mit dem Mittelstück zu ermitteln. Nun haben bereits Untersuchungen unter anderem von Sachs und seinen Mitarbeitern[2]) Anhaltspunkte dafür ergeben, daß die Mittelstückfunktion ebensowenig wie die des Endstücks von einem einheitlichen Körper ausgeübt wird, und es ist mit dem Anwachsen der physikalisch-chemischen, biologischen und rein chemischen Differenzierungsmöglichkeiten zu erwarten, daß der bisher recht groben Analyse der Komplementwirkung, die sich namentlich nach der chemischen Seite noch in den ersten Anfängen befindet, eine weitere Zerlegung in einzelne wirksame Faktoren gelingen wird. Dabei wird man sich vergegenwärtigen müssen, daß verschiedene Funktionen einerseits durch verschiedene Körper von verschiedenem chemischen

1) l. c.

2) Zeitschr. f. Immunitätsf., Orig., Bd. 11, p. 710; Bd. 13, p. 62; Bd. 15, p. 145, 157; Bd. 10, p. 284; Bd. 26, p. 483, 503; Bd. 21, p. 259

Aufbau, andererseits aber durch einen und denselben chemischen Körper je nach seinem physikalisch-chemischen Zustand ausgeübt werden können; man wird sich vor allem darüber klar sein müssen, daß man durch die bisher zur Trennung der Komplementkomponenten zumeist angewendeten, verhältnismäßig groben serologischen und physikalisch-chemischen Methoden nur grobe Bruchstücke abzutrennen vermochte, deren mosaikartiger Aufbau aus verschiedenen, auch chemisch zu differenzierenden Bausteinen wiederum durchaus wahrscheinlich erscheint. Nach den Untersuchungen von Sachs und seinen Mitarbeitern[1]) ist bisher die weitere Annahme einer sogenannten 3. Komponente des Komplements gerechtfertigt, die bei der Säurefällung des Meerschweinchenserums zum Teil im Albuminteil zurückbleibt, größtenteils aber in den Globulinteil übergeht, also als Bruchstück des Mittelstücks anzusehen ist.

Es fragte sich daher, ob die agglutinationsfördernde Wirkung an Teile des Mittelstücks, einschließlich der 3. Komponente, gebunden wäre.

Die 3. Komponente des Komplements wird bekanntlich unter anderem durch Cobragiftwirkung zerstört, bei der die übrigen Teile des End- und Mittelstücks erhalten bleiben, während sie sich gegenüber dem Einfluß der Hitze, also bei der Thermoinaktivierung, als resistenter erweist. So vermag $^1/_4$ Stunde bei 55° und $^1/_2$ Stunde bei 54° erhitztes Serum, das sowohl die Endstück- als auch die Mittelstückwirkung verloren hat, das durch Cobragift seiner hämolytischen Wirkung beraubte Serum zu restituieren, also mit anderen Worten als 3. Komponente zu wirken.

In den in Tabelle V angeführten und in noch anderen Versuchen erwies sich das agglutinationsfördernde Prinzip als noch resistenter gegenüber dem Erhitzen als die schon relativ thermostabile 3. Komponente. Bei halbstündigem Erhitzen bei 56° war die agglutinationsfördernde Wirkung des Globulinteils als anscheinend auch des unbehandelten Serums unverändert nachweisbar (sie wurde in dem betreffenden Versuch erst nach $2^1/_4$ Stunde bei 56° zerstört). Dabei war die Fähigkeit, in Gemeinschaft mit Endstück als hämolytisches Komplement zu wirken, also die Mittelstückwirkung, vollständig verloren gegangen, desgleichen auch die restitutierende Wirkung auf das durch

1) l. c.

Cobragift inaktivierte Serum, die der 3. Komponente zugeschrieben wird.

Tabelle V.

Agglutination bzw. Hämolyse von 0,5 ccm 5-proz. Hammelblutkörperchen, versetzt mit je 0,5 ccm homologem Immunserum (Kaninchen) in allein nicht agglutinierender Dosis (1 : 1000) (hämolytischer Titer 1 : 8000, agglutinierender Titer 1 : 500).

I. Unter Zusatz von fallenden Mengen:
   1) CO_2-Sediment (Mittelstück), konzentriert, unerhitzt 1/2 Stunde bei Zimmertemperatur gestanden.
   2) CO_2-Sediment, konzentriert, 1/2 Stunde bei 56°.
   3) Serum 1/2 Stunde bei 56° (komplementfrei).

II. Unter Zusatz gleicher Mengen CO_2-Abguß (1 : 5 verdünnt 0,5) und fallender Mengen[1]):
   1) CO_2-Sediment (Mittelstück), konzentriert, unerhitzt 1/2 Stunde bei Zimmertemperatur gestanden.
   2) CO_2-Sediment, konzentriert, 1/2 Stunde bei 56°.
   3) Serum 1/2 Stunde bei 56° (komplementfrei).

III. Unter Zusatz gleicher Mengen von mit Cobragift behandeltem Serum (frei von 3. Komponente) und fallender Mengen:
   1) CO_2-Sediment (Mittelstück), konzentriert, unerhitzt 1/2 Stunde bei Zimmertemperatur gestanden.
   2) CO_2-Sediment, konzentriert, 1/2 Stunde bei 56°.
   3) Serum 1/2 Stunde bei 56° (komplementfrei).
   4) CO_2-Abguß (Endstück).
   5) Serum 1/4 Stunde bei 55° (frei von Mittel- und Endstück, enthaltend 3. Komponente).

Gesamtvolumen 2,5 ccm, Ablesung nach 20 Stunden bei Zimmertemperatur.

	A. Agglutination			B. Hämolyse							
Fallende Mengen	I.			II.			III.				
	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.	4.	5.
0,6	+++	+++	+++	k	g	Spch	.	.	.	.	.
0,4	+++	+++	+++	k	g	g	.	.	.	.	.
0,2	+++	+++	+++	k	0	0	.	.	.	.	.
0,1	+++	+++	+++	k	0	0	.	.	.	.	.
0,06	+++	+++	+++	k	0	0	k	g	g	k	k
0.04	++	++	+++	k	.	.	k	0	g	k	k
0,02	++	++	++	k	.	.	k	0	0	mfk	k
0.01	+	+	+	m	.	.	k	0	0	m	fk
0,006	—	—	—	Sp	.	.	m	0	0	Sp	w
0.004	—	—	—	g	.	.	m—w	0	0	g	Sp
0,002	—	—	—	0	.	.	Sp	0	0	g	0
0,001	—	—	—	0	.	.	0	0	0	0	0
0	—	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0

1) Einfüllung der Reagentien in der Reihenfolge: 1) Blutkörperchen, 2) CO_2-Sediment, stehen lassen, 3) Abguß.

Die Inaktivierung des Meerschweinchenserums durch Cobragift wurde in diesen Versuchen vorgenommen, indem 5 Teile Meerschweinchenserum mit 2 Teilen einer 3–6-fach verdünnten 1-proz. Cobragiftlösung (Lamb II) 1 Stunde bei 37° digeriert wurden.

Von Interesse, unter anderem auch für die Beurteilung der eben angeführten Versuche, war noch das Verhalten des agglutinationsfördernden Prinzips bei der sogenannten Brandschen Modifikation[1]) des Mittelstücks.

Nach kurzem Lagern verliert bekanntlich das mit Kochsalzlösung verdünnte Mittelstück, wenn man es vor dem Zusatz der sensibilisierten Blutkörperchen mit Endstück mischt, die Fähigkeit, mit diesem zusammen hämolytisch zu wirken, während es, zuerst mit den sensibilisierten Blutkörperchen gemischt und einige Zeit digeriert, dann erst mit Endstück versetzt, Hämolyse bewirkt.

Tabelle VI.

I. Hämolyse, II. Agglutination

von 0,5 ccm Hammelblutkörperchen (5-proz.) mit Zusatz gleicher Mengen allein nicht agglutinierenden Immunserums und fallenden Mengen

1. mit frischen, mit Kochsalzlösung 1:1 verdünnten CO_2-Sediments,
2. mit Kochsalzlösung 1:1 verdünnten, 5 Stunden bei 22° gelagerten Sediments
   a) ohne Zusatz von Endstück,
   b) mit Zusatz von Endstück 1:5 0,5 ccm und folgender Reihenfolge der Einfüllung:
      α) 1. CO_2-Sediment, 2. Blutkörperchen, 3. Endstück;
      β) 1. CO_2-Sediment, 2. Endstück, 3. Blutkörperchen.

Fallende Mengen der Globulin-fraktion	I. Hämolyse				II. Agglutination		
	1	2a	2b α	2b β	1	2a	2b β
0,06	0	0	k	0	+++	+++	+++
0,04	0	0	k	0	++	+++	+++
0,02	0	0	k	0	+	++	++
0,01	0	0	m	0	—	—	+
0,006	0	0	0	0	—	—	—
0	0	0	0	0	—	—	—

1) Berliner klin. Wochenschr., 1907, p. 1075.

Hier war also trotz des Ausbleibens der Hämolyse bei Zusatz von gelagertertem, mit Kochsalzlösung verdünnten CO_2-Sediment zum CO_2-Abguß (vgl. unter I 2b β im Gegensatz zu 2b α), also trotz des Auftretens der Brandschen Modifikation des Mittelstücks, die agglutinationsfördernde Wirkung unbeeinflußt geblieben.

Wir haben also in wichtigen Eigenschaften Unterschiede zwischen agglutinationsfördernder Komponente und dem Mittelstück einschließlich der 3. Komponente zu verzeichnen, die aber nicht ausschlossen, daß trotzdem die agglutinationsfördernde Wirkung zum Zustandekommen der Hämolyse nötig, also an Teile des Mittelstücks gebunden war. Tatsächlich lassen Reagenzglasversuche, über die nach ihrem Abschluß in einer weiteren Mitteilung berichtet werden soll, schon jetzt mit einiger Wahrscheinlichkeit darauf schließen, daß die agglutinationsfördernde Komponente des Normalserums als Glied des Mittelstücks zu betrachten ist.

Bekanntlich braucht bei Versuchen in vitro die Hämagglutination durchaus nicht als Vorstufe der Hämolyse durch Immunserum in Erscheinung zu treten. Selbst unter dem Mikroskop kann man hierbei eine Auflösung von roten Blutkörperchen beobachten, ohne daß sich vorher auch nur eine Spur einer Zusammenballung bemerkbar macht. Trotzdem kann man für Versuche in vitro vermuten, daß auch hier die Veränderung der mit Immunserum beladenen Blutkörperchen durch die agglutinationsfördernde Wirkung des Komplements, die zu einer Zusammenballung der roten Blutkörperchen führen kann, für den Ablauf des hämolytischen Vorgangs von Bedeutung ist.

Anders dagegen bei Versuchen in vivo. Hier scheint nach den Organdurchströmungsversuchen von Hahn und v. Skramlik[1]) der Hämolyse fast stets eine Agglutination und Bindung der Blutkörperchen an das Organ vorauszugehen. Gerade aus diesen Versuchen ergibt sich die Bedeutung der

---

1) Biochem. Zeitschr., Bd. 98, 1919, p. 120.

Agglutination für die Hämolyse in vivo, an der vermutlich die agglutinationsfördernde Wirkung des Mittelstücks mit in erster Linie beteiligt ist.

Zusammenfassung.

Normalserum fördert die Agglutination von homologen und heterologen Blutkörperchen und solchen des gleichen Tieres, die mit homologem Immunserum oder Normalagglutinine enthaltendem Normalserum versetzt sind. Diese agglutinationsfördernde Wirkung ist bei der Kohlensäurebehandlung des Serums an das „Sediment" gebunden und fehlt dem Abguß. Sie unterscheidet sich in wichtigen Eigenschaften von der Gesamt-Mittelstückwirkung und der 3. Komponente des Mittelstücks und wird wahrscheinlich von besonderen Teilen des Mittelstücks ausgeübt.

[Aus dem Hygiene-Institut der Universität Greifswald.]

Notiz zur Arbeit von v. Gutfeld: „Die Hitzebeständigkeit gebundener Antikörper" p. 197 dieses Heftes.

Von **E. Friedberger.**

Bezüglich dieser Arbeit sei auf die Ausführungen im Nachtrag bei der Korrektur zur Arbeit Lange: „Zur Frage der Hitzebeständigkeit der gebundenen Antikörper" (diese Zeitschrift, Bd. 32, p. 449) verwiesen. Es ist dort bereits betont worden, daß die Unterschiede bezüglich der Thermoresistenz der gebundenen Antikörper bei Lange einerseits und Spät andererseits auf einer ungenügenden Absättigung

in den Versuchen von Spät beruhen dürften. Bei der Arbeit von v. Gutfeld tritt das noch viel deutlicher hervor. Der Autor begeht den prinzipiellen Fehler, Antikörperbindung und völlige Absättigung zu verwechseln. Wenn er schreibt (p. 200):

„Die Abgüsse (sc. nach einmaliger Beladung!) enthalten noch reichliche Mengen hämolytischen Ambozeptor; der Zusatz von 300 l. D. hatte also sicherlich zur Absättigung genügt“

und weiterhin (p. 203):

„Sämtliche sechs Röhrchen werden mit 1 ccm Organantiserum-Verdünnung 1 : 2 = 400 l. D. beschickt und kommen für 45 Minuten ins 37° Wasserbad. Nach Zentrifugieren wird die überstehende Flüssigkeit geprüft: sämtliche Sedimente haben einen Teil des dargereichten Organantiserums verankert; ein beträchtlicher Teil ist aber noch im Abguß nachweisbar, es hat also Absättigung stattgefunden“[1]),

so berücksichtigt er nicht die seit Eisenberg und Volk[2]) bekannten Absorptionsgesetze der Agglutinine. Danach ist die Absorption durch eine gegebene Bakterienmenge überhaupt nur bis zu einem gewissen geringen Antikörperzusatz eine vollständige. Von da an aber wird sie immer unvollständiger, je mehr der absolute Wert des zur Bindung zugesetzten Agglutinins zunimmt, so daß immer größere Agglutininmengen in der überstehenden Flüssigkeit zurückbleiben, d. h. der Absorptionskoeffizient immer weiter unter seinen höchstmöglichen Wert sinkt.

Die Erklärung dieser Tatsache auf Grund des Guldberg-Waageschen Gesetzes der Massenwirkung oder des Verteilungsgesetzes nach Arrhenius kann hier nicht weiter erörtert werden und darf auch bei den Lesern dieser Zeitschrift als bekannt vorausgesetzt werden.

Jedenfalls aber beweist das Vorhandensein von Antikörpern im Abguß bei Zusatz so großer Antikörpermengen, wie sie v. Gutfeld angewandt hat, nicht, daß nun etwa eine vollständige Beladung aller haptophoren Gruppen des Antigens eingetreten ist. Ja, im Gegenteil, wir wissen, daß gerade

1) Im Original nicht gesperrt.

2) Eisenberg und Volk, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 40, 1902.

unter diesen Verhältnissen nach den vorliegenden Gesetzen sicher eine große Menge von Antikörpern im Abguß noch vorhanden sein muß, ohne daß daraus auch nur im entferntesten auf eine Absättigung aller Gruppen des Antigens geschlossen werden darf. Diese ist aber, wie Friedberger und Pinczower, Kumagai sowie Lange[1]) gezeigt haben, für den Nachweis der Thermoresistenz der gebundenen Antikörper unerläßlich.

Absättigungsversuche, die in unserem Institut von Herrn Dr. Hsü mit heterogenetischem hämolytischen Ambozeptor und entsprechendem Antigen angestellt worden sind, haben ergeben, daß zu einer vollständigen Absättigung eine mindestens 6malige Behandlung mit entsprechenden Serummengen notwendig ist.

Es sei noch erwähnt, daß in letzter Zeit Taniguchi[2]) erneut darauf hingewiesen hat, daß gerade die Heteroantigene sich besonders schwer völlig absättigen lassen.

Danach können die Versuche von v. Gutfeld keinerlei Beweiskraft in der Frage der Thermoresistenz der gebundenen Antikörper beanspruchen, da ein Beweis für die vollkommene Absättigung der Antigene nicht erbracht ist, ja, die ganze Versuchsanordnung mit absoluter Sicherheit das Gegenteil erschließen läßt.

Bemerkungen zu vorstehender Notiz des Herrn Friedberger.

Von **F. v. Gutfeld.**

Der von Friedberger erhobene Einwand, daß in unseren Versuchen eine Absättigung nicht stattgefunden habe, beruht auf theoretischen Ueberlegungen, die sich auf die Absättigungsgesetze der Agglutinine stützen. Abgesehen davon, daß die Verhältnisse bei der Agglutininbindung nicht ohne weiteres

1) Literatur siehe bei Lange, a. a. O.

2) Taniguchi, Journ. of Pathol. and Bact., Vol. 24, 1921, No. 4, p. 456.

auf die Bindungsverhältnisse des heterogenetischen Antikörpers übertragen werden dürfen, hätte ein Blick in die Protokolle unserer Arbeit Friedberger belehren können, daß seine theoretische Annahme irrig ist. Wir haben durch Einführung einer Kontrolle (Reihe 3 des Versuchs I) nachgewiesen, daß durch unsere Versuchsanordnung tatsächlich eine Absättigung des Antigens erfolgt ist: das nicht nachträglich erhitzte Sediment ist nicht mehr imstande gewesen, vorgelegten Antikörper zu binden. Die Absättigung war also eine vollkommene. Damit erledigen sich die theoretischen Einwendungen Friedbergers.

Bemerkung hierzu.

Von **E. Friedberger.**

Daß mit einmaliger Beladung Antigene nicht völlig abgesättigt werden, entspricht nicht theoretischen Ueberlegungen, sondern ist eine allgemein bekannte Tatsache, die nach den von mir zitierten Befunden gerade für die Bindungsverhältnisse der heterogenetischen Antikörper insbesondere Geltung hat.

Selbst wenn in dem einen Protokoll von v. Gutfeld, in dem ein entsprechender Kontrollversuch mitgeteilt ist (Protokoll I), die Absättigung bei einmaliger Beladung vollständig gewesen wäre, so bewiese es noch nichts für die anderen Versuche (z. B. Versuch II). Tatsächlich ist aber auch in Protokoll I entgegen der Schlußfolgerung von v. Gutfeld die Absättigung, wie es sich aus seinem eigenen Protokoll ergibt, nicht vollständig gewesen. Wenn man die Stäbe 3 und 6 im Protokoll I miteinander vergleicht, so ergibt sich aus dem Grad der Hämolyse (die Titration ist leider nicht bis zu Ende protokolliert) offenkundig, daß der Abguß von dem „abgesättigten", nicht erhitzten Sediment im Vergleich zu einer entsprechenden Menge von Antiserum allein geringere Hämolyse gezeigt hat. Damit entfällt die Berechtigung der Schlußfolgerung von v. Gutfeld bezüglich

der an das Antigen gebundenen haptaphoren Gruppe des Antikörpers, auf die sich allein meine und meiner Schüler Untersuchungen beziehen, nicht nur auf Grund theoretischer Ueberlegungen und der Tatsachen der Literatur, sondern auch auf Grund seines eigenen Versuchsprotokolls.

Schlußwort.

Von **F. v. Gutfeld.**

1) In meiner Arbeit sind drei verschiedene Versuchsanordnungen mitgeteilt, deren jede „in mehrfachen Reihen an verschiedenen Versuchstagen mit gleichsinnigem Ergebnis ausgeführt“ wurde. Diesen Satz hat Friedberger offenbar übersehen, sonst würde er sich in seiner „Bemerkung“ nicht auf „ein Protokoll“, in dem mir der Nachweis meiner Behauptung gelungen sei, beziehen. Schon die erste Versuchsanordnung beweist also, daß der an sein Antigen gebundene heterogenetische Antikörper nicht hitzebeständig ist.

2) Der Transgressionsversuch beweist in jedem Falle die fehlende Thermoresistenz des gebundenen Organantiserums, wenn man nicht die gewaltsame Annahme machen will, daß infolge der Erhitzung die Bindung so fest wird, daß eine Absprengung unmöglich wird.

3) Durch die dritte Versuchsanordnung wird bewiesen, daß an sein Antigen gebundenes Organantiserum nach der Erhitzung kein Komplement mehr bindet. Für diesen Versuch ist eine „Absättigung“ ebensowenig erforderlich wie für Versuch II. Die mangelnde Fähigkeit der Komplementbindung nach der Erhitzung beruht auf einer Schädigung der komplementophilen Gruppe des an sein Antigen gebundenen Organantiserums infolge der Erhitzung.

Damit dürfte die Frage der Thermoresistenz des gebundenen Organantiserums im negativem Sinne entschieden sein.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena. — 4973

Zeitschrift f. Immunitätsforschung. Originale. Bd. 33. Heft 4|5.

[Aus dem Hygiene-Institut der Universität Greifswald
(Direktor: Prof. Dr. E. Friedberger).]

Antikörperbildung durch Transplantate.

Von Dr. **K. Oshikawa.**

Mit 6 Abbildungen im Text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 1. Juni 1921.)

Seit den Untersuchungen von Friedberger und Girgolaff[1]) sowie Girgolaff[2]) ist es bekannt, daß durch die Transplantation von Organen immunisierter Tiere auf andere Individuen der gleichen Spezies Antikörper in dem Organempfänger entstehen, die gegen das zur Sensibilisierung des Spenders benutzte Antigen gerichtet sind. Außer den Organen des hämatopoëtischen Systems eignet sich auch z. B. die Niere zu derartigen Versuchen. Entsprechend der Tatsache, daß für die Antikörperproduktion nach Pfeiffer und Marx[3]), Deutsch[4]) u. a. die Milz als eine der Hauptstätten in Frage kommt, ist auch die Antikörpersteigerung im Empfängertier besonders intensiv, wenn Milzgewebe als Transplantat benutzt wird. Der Mechanismus der Antikörperproduktion im Empfängertier scheint dabei der zu sein, daß das implantierte Gewebe die Antikörperbildung nach seiner Einheilung weiter verursacht, wie vor der Transplantation im Spendertier selbst. Es scheint sich nicht um eine passive Uebertragung von Antikörpern zu handeln.

Im folgenden habe ich auf Veranlassung von Herrn Prof. Friedberger und unter seiner Leitung versucht, die Frage

1) Diese Zeitschr., Bd. 9, 1911, p. 575.
2) Diese Zeitschr., Bd. 12, 1912, p. 401.
3) Zeitschr. f. Hyg., Bd. 27, 1898. p. 272.
4) Ann. d. l'Inst. Past., T. 13, 1899, p. 689; Wiener med. Presse, 1899.

zu beantworten, ob auch durch Uebertragung von Hautlappen Antikörperproduktion zu erzielen ist. Als Versuchstiere wurden ausschließlich Kaninchen benutzt. Die Haut wurde vom Spenderohr genommen und auf das Empfängerohr überpflanzt. Die Versuchstechnik gestaltete sich, wie folgt:

Die Innenseite des Ohres wurde mit Wasser und Seife gründlich gereinigt und dann mit Watte getrocknet. Darauf wurde die ganze Fläche mit Jodtinktur eingepinselt. Nunmehr wurde mit einem scharfen Messer die Epidermis nebst Cutis bis auf die Subcutis durchtrennt und vorsichtig von ihr abgelöst. Die abgelösten Stücke hatten jedesmal die Größe von 1,2 : 1,8 cm. Die abgelösten Hautläppchen brachten wir in körperwarme physiologische Kochsalzlösung, in der sie verblieben, bis das Ohr des Empfängertieres in gleicher Weise zur Aufnahme des Transplantates präpariert war. Die Transplantation erfolgte, indem das Hautläppchen aus der Kochsalzlösung herausgefischt, auf einem Gasetupfer ausgebreitet und dann auf die ebenfalls von Epidermis und Cutis entblößte Stelle des Empfängertieres leicht aufgedrückt wurde. Die Transplantationen wurden stets nach nebenstehendem Schema vorgenommen. Dann wurde aseptische Verbandgaze in die Ohrmuschelhöhlung hineingelegt, und die Ränder des Ohres mit einigen Situationsnähten zur Fixierung des Verbandstoffes vernäht. Der Verbandwechsel erfolgte zum ersten Male nach 7 Tagen, der zweite am 12. Tag, der dritte am 17. Tag. Zeigte es sich, daß eine Heilung per primam nicht erfolgt war, sô mußte der Verbandwechsel, da die Sekretion zu stark wurde, natürlich in kürzeren Intervallen, etwa 2—3 Tagen, vorgenommen werden.

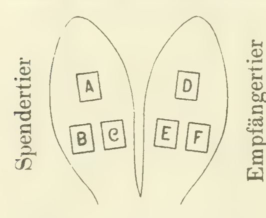


Fig. 1. A auf D; B auf E; C auf F.

Zunächst wurde in einer Reihe von Vorversuchen darüber Klarheit zu erlangen versucht, welches Schicksal das Transplantat, also in unserem Falle Kaninchenhaut, bei der von uns angewandten Technik erleidet. Es zeigte sich, daß die Uebertragung der Hautlappen von einem Ohr zum anderen desselben Tieres, also die Autotransplantation, jedesmal mit Sicherheit gelang und das Transplantat restlos zur Anheilung kam. Nicht gleich günstige Ergebnisse erzielten wir, wenn es sich um Uebertragung von einem Tier auf ein zweites handelte, also um homöoplastische Operationen. Hier war das Resultat recht wechselnd. Einmal gelang die Anheilung per primam, ein andermal blieb sie aus, und das Transplantat kam zur Abstoßung, ohne daß Ursachen technischer Natur hätten nachgewiesen werden können. Selbst bei Tieren

angeblich desselben Wurfes war der Erfolg unserer homöoplastischen Operationen nicht immer ein zufriedenstellender, da auch hier ein Teil der übertragenen Hautlappen nicht zur Anheilung kam. Allerdings konnten wir für die Blutsverwandtschaft der Tiere nicht garantieren, obwohl sie in ihrem Aeußeren einander absolut glichen, da sie nicht bei uns zum Wurf gekommen waren. Die Resultate sind nicht weiter überraschend, da es ja aus zahlreichen chirurgischen Publikationen bekannt ist, daß die autoplastischen Transplantationen zwar bei einwandfreier Technik mit großer Sicherheit gelingen, die homöoplastischen dagegen in ihrem Erfolge sehr unsicher sind.

Das Gelingen der Transplantation ist aber unerläßliche Vorbedingung für die Lösung der unserer Arbeit zugrunde liegenden Aufgabe, nämlich den Nachweis zu erbringen, ob es möglich ist, durch Ueberpflanzung von Hautlappen die Antikörperproduktion im Empfängertier anzuregen. Zu einem einwandfreien Resultat kann man in Anbetracht der schwierigen Begleitumstände nur gelangen, wenn große Versuchsreihen an einem ausgedehnten Tiermaterial sich durchführen lassen. Bei dem zurzeit bestehenden Tiermangel war natürlich diese Forderung nicht restlos zu erfüllen. Immerhin scheinen uns auch die jetzt gewonnenen Ergebnisse eines Interesses wert zu sein.

1. Versuch.

Von Kaninchen No. 5 ♀, Gewicht 3200 g, das einen Paratyphus B agglutinierenden Titer von 1 : 640 hatte, werden 6 Hautlappen auf Kaninchen No. 22 ♀, Gewicht 1900 g, überpflanzt. Die Transplantate waren nach 2 Wochen alle abgestoßen, keins zur Anheilung gelangt. Trotzdem zeigte das Empfängertier nach 7 Tagen eine Titersteigerung von 0 auf 1 : 5, nach 9 Tagen auf 1 : 10, höher stieg der Titer nicht an. Das Auffallende dieses Versuches ist, daß eine, wenn auch geringe, Titersteigerung sich erzielen ließ, obwohl das Transplantat nicht zur Anheilung kam. Allerdings könnte diese Titersteigerung noch im Rahmen physiologischer Schwankungen

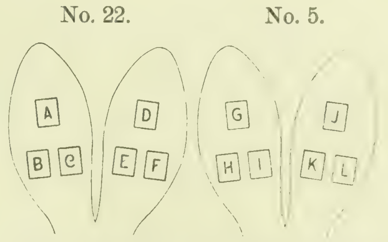


Fig. 2. Normales Tier No. 22. Paratyphus agglutinierendes Tier No. 5.

liegen; doch spricht dagegen die Regelmäßigkeit in zahlreichen weiteren Versuchen.

Kaninchen 22.

Zeichen der aufgelegten Stellen	Zeichen der abgenommenen Stellen	Schicksal der Transplantate nach 2 Wochen	Resultat[1]) der Agglutinationsprüfung
A	G	abgestoßen	nach 7 Tagen
B	H	„	1/5
C	I	„	nach 9 Tagen
D	J	„	1/10
E	K	„	nach 13 Tagen
F	L	„	1/10

2. Versuch.

Dem Kaninchen No. 32 ♀ wurden an 6 Stellen der beiden Ohren je $^1/_{100}$ Oese abgetöteten X 19 eingespritzt und nach 24 Stunden die betreffenden Hautstellen dem normalen Kaninchen No. 33 ♀ überpflanzt. Die Kaninchen 33 entnommenen Hautlappen wurden auf Kaninchen 32 zurücktransplantiert. Tiergewichte K. 32 1500, K. 33 1550.

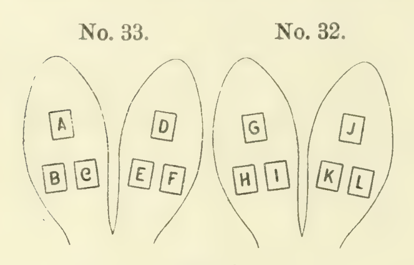


Fig. 3.

Hier war das Ergebnis der Transplantation ein besseres. Von den 6 übertragenen Hautlappen kamen nur 3 zur Abstoßung, 3 heilten leidlich gut an. Der Titer stieg von 0 auf 1:10 am 5. Tage und blieb auf dieser Höhe.

Kaninchen No. 32 (mit Proteus vorgespritzt).

Zeichen der aufgelegten Stellen	Zeichen der abgenommenen Stellen	Schicksal der Transplantate nach 30 Tagen	
A	G	$^1/_3$ angeheilt	
B	H	$^1/_3$ angeheilt	
C	I	Spur angeheilt	
D	J	$^2/_3$ angeheilt	
E	K	stark geschrumpft	
F	L	$^2/_3$ angeheilt	

1) Titer vor der Transplantation 0.

Kaninchen No. 33 (normal).

Zeichen der aufgelegten Stelle	Zeichen der abgenommenen Stellen	Schicksal der Transplantate nach 30 Tagen	Resultat der Agglutination[1])
G	A	gut angeheilt	nach 5 Tagen
H	B	mit klein. Zentralnarbe angeheilt	1/10
I	C	$^1/_2$ gut angeheilt	nach 10 Tagen
J	D	abgestoßen	1/10
K	E	„	nach 15 Tagen
L	F	„	1/10

3. Versuch.

Dem Kaninchen No. 15 wurde an 8 verschiedenen Stellen der beiden Ohren wieder $^1/_{100}$ Oese Proteus X 19 eingespritzt und die betreffenden Hautläppchen gleich darauf dem Kaninchen No. 41 überpflanzt. Gewicht K. 15 1900 g, K. 41 1500 g.

Von den 8 Transplantaten sind nur 2 abgestoßen worden, die anderen 6 kamen gänzlich oder teilweise zur Anheilung. Das Ergebnis der serologischen Prüfung war ein weitaus besseres als in den beiden vorhergehenden Versuchen. Der Titer war am 5. Tage von 0 auf 1:20, am 9. Tage auf 1:160 angestiegen.

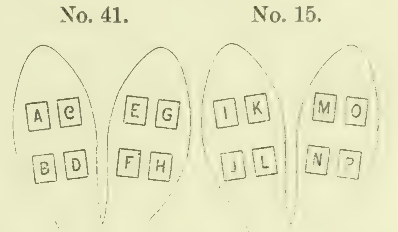


Fig. 4. No. 41: Normales Tier. No. 15: Mit $^1/_{100}$ Oese abgetöteten X 19 intrakutan vorbehandeltes Tier.

Kaninchen No. 41.

Zeichen der aufgelegten Stellen	Zeichen der abgenommenen Stellen	Schicksal der Transplantate nach 3 Wochen	Resultat der Agglutination[1])
A	I	Randzone angeheilt	nach 5 Tagen
B	J	Peripherie $^1/_3$ angeheilt	1/20
C	K	Peripherie $^1/_2$ angeheilt	
D	L	tadellos angeheilt	nach 9 Tagen
E	M	abgestoßen	1/160
F	N	tadellos angeheilt	
G	O	abgestoßen	
H	P	tadellos angeheilt	

Man geht wohl nicht fehl, wenn man die relativ hohe Titersteigerung in diesem Falle auf Antigenübertragung zurückführt. Denn die Resorption der $^1/_{100}$ Oese Bazillen hat wohl

1) Titer vor der Transplantation 0.

nur zum kleinen Teil in der kurzen Zeit von der Injektion bis zur Ausführung der Transplantation erfolgen können. Die Verhältnisse liegen also hier nicht wesentlich anders, als wenn man dem Empfängertier das Antigen per primam intentionem ohne Vermittlung des Spendertieres beigebracht hätte. Auch für Versuch 2 mag diese Erklärung die naheliegendste sein, denn auch hier dürften wohl nach 24 Stunden noch ausreichend Antigenreste in den Transplantaten vorhanden gewesen sein, um die Agglutininbildung im Empfängertier anzuregen. Im Versuch 1 allerdings erscheint es sehr zweifelhaft, ob die Agglutinbildung durch Antigenreste hervorgerufen sein kann, denn die Injektion des Spendertieres war etwa 8 Tage vor Ausführung der Transplantation erfolgt, und zwar intravenös, so daß die in der Ohrhaut eventuell deponierten Antigenmengen, wenn überhaupt, dann jedenfalls so minimale hätten sein müssen, daß sie auch zur geringsten Agglutininbildung kaum ausgereicht hätten. Es bleibt hier nur übrig, eine Weiterproduktion von Agglutininen durch die transplantierten Zellen und eine Resorption der produzierten Agglutinine durch das Empfängertier anzunehmen.

Da uns, wie aus obigen Versuchen ersichtlich, der Nachweis von Agglutininen im Empfängertier gelungen war, so lag es nahe, entsprechende Versuche mit Präzipitintieren auszuführen. Der erste Versuch dieser Art verlief völlig negativ. Das Spendertier hatte einen Präzipitationstiter für Ziegenserum von 1:2000. Die Transplantate kamen alle nicht zur Anheilung. Vielleicht liegt hierin der Grund, daß sich eine Präzipitinbildung im Empfängertier nicht nachweisen ließ. Ein zweiter Versuch hatte ein positives Ergebnis. Das Spendertier, intravenös vorbehandelt mit Hühnerserum, hatte ebenfalls einen Titer von 1:2000. Die letzte Injektion lag 8 Tage vor der Transplantation. Die Transplantate kamen alle zur Anheilung. Das Empfängertier präzipitierte am 6. Tage nach

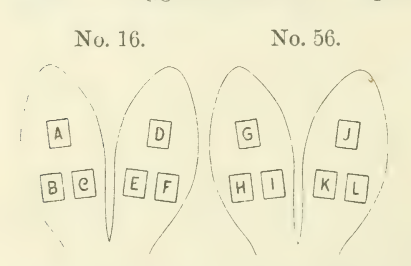


Fig. 5. No. 16: Normales Kaninchen. No. 56: Präzipitierendes Kaninchen, am 20. V. entblutet.

der Operation Hühnerserum bis 1:20. Der Titer ist seitdem nicht mehr angestiegen.

Kaninchen 16.

Zeichen der aufgelegten Stellen	Zeichen der abgenommenen Stellen	Schicksal der Transplantate nach 2 Wochen	Resultat der Präzipitation[1]
A	G	tadellos angeheilt	nach 7 Tagen
B	H	,, ,,	1/20
C	I	,, ,,	nach 9 Tagen
D	J	,, ,,	1/20
E	K	,, ,,	
F	L	,, ,,	

In einer größeren Versuchsreihe und unter den gleichen Versuchsbedingungen wie oben wurde die Hämolysinbildung im Empfängertier geprüft. Wir verzichten darauf, sämtliche Protokolle anzuführen. Es mag genügen, als Beispiel eines derartigen Versuches folgendes Protokoll zu bringen.

Kaninchen No. 5, 3mal in 8-tägigen Intervallen intravenös mit Hammelblut vorbehandelt, hämolytischer Titer gegen Hammelblut 0,0004, Gewicht 1500 g, unvorbehandeltes Kaninchen No. 11, hämolytischer Titer weniger als 0,3, Gewicht 850 g, unvorbehandeltes Kaninchen No. 12, hämolytischer Titer weniger als 0,3, Gewicht 1450 g. Je drei Hautstücke von Kaninchen 5 werden auf Kaninchen 11 und 12 und umgekehrt, ferner 3 Hautstücke von Kaninchen 11 auf 12 und umgekehrt transplantiert. Bei Kaninchen 11 erfolgte größtenteils gute Anheilung, der Titer stieg nach 8 Tagen auf 0,04. Bei Kaninchen 12 heilte keiner der Hautlappen von Kaninchen 5 an. Der Titer stieg innerhalb 8 Tagen auf 0,08.

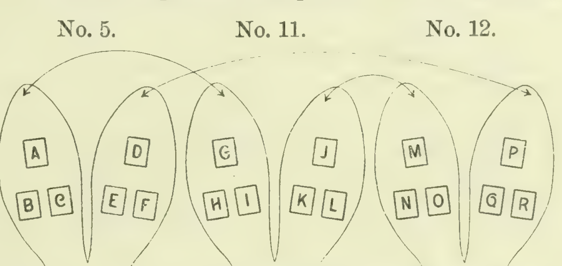


Fig. 6. No. 5: Mit Hammelblut vorbehandeltes Tier. No. 11 und 12: Normale Tiere.

Im ersten Falle also eine Titersteigerung um das 10-fache, im zweiten Falle aber auch, trotz völliger Abstoßung der Transplantate, eine deutliche Steigerung des hämolytischen Index. Im letzteren Falle müssen wir annehmen, daß anfänglich doch eine partielle Anheilung erfolgt oder daß die

1) Titer vor der Transplantation 0.

transplantierten Zellen zunächst noch funktionstüchtig geblieben sind und die Antikörper an die leicht resorbierende Wundfläche abgegeben werden.

Kaninchen No. 5 (immunisiert).

Zeichen der aufgelegten Stellen	Zeichen der abgenommenen Stellen	Schicksal der Transplantate nach 1 Monat
A	G	abgestoßen u. vernarbt
B	H	,, ,,
C	I	,, ,,
D	P	,, ,,
E	Q	,, ,,
F	R	,, ,,

Kaninchen No. 11 (Normaltier).

Zeichen der aufgelegten Stellen	Zeichen der abgenommenen Stellen	Schicksal der Transplantate nach 1 Monat	Resultat der Hämolyse	
			Vor der Transpl. Titer	8 Tage nach der Transpl
G	A	gut angeheilt		
H	B	,, ,,		
I	C	,, ,,		
J	M	abgestoßen		
K	N	größtenteils angeheilt	> 0,3	0,04
L	O	$^1/_2$ angeheilt		

Kaninchen No. 12 (normal).

Zeichen der aufgelegten Stellen	Zeichen der abgenommenen Stellen	Schicksal der Transplantate nach 1 Monat	Resultat der Hämolyse	
			Vor der Transpl.	8 Tage nach der Transpl
M	J	abgestoßen u. vernarbt		
N	K	größtenteils angeheilt		
O	L	,, ,,		
P	D	abgestoßen		
Q	E	,,	> 0,3	0,08
R	F	,,		

Sämtliche weiteren Versuche in dieser Richtung lieferten dasselbe Ergebnis. Immer erfolgte, ob nun das Transplantat zur dauernden Anheilung kam oder nicht, eine Titersteigerung, mindestens um das 5-fache, manchmal auch um das 20 fache. Sämtliche Spendertiere hatten etwa 8 Tage vor der Operation die letzte Injektion, und zwar intravenös erhalten. Eine Uebertragung von Antigenresten ist infolgedessen nicht wahrscheinlich, wenn auch natürlich die Möglichkeit einer aktiven Antikörperbildung durch Antigenreste im Transplantat nicht ganz

von der Hand zu weisen ist. Das bei den Agglutinintieren Gesagte gilt auch für diese Versuche.

In weiteren Versuchen suchten wir festzustellen, ob ein Antikaninchenserum, im Reagenzglas in Kontakt mit den Hautläppchen gebracht, diese irgendwie schädigt. Es stand uns Serum zweier mit Kaninchenblutkörperchen behandelter Ziegen zur Verfügung, die einen beträchtlichen Titer für Kaninchenblut hatten. Es bestand die Möglichkeit, daß beim Aufenthalt von Kaninchenhautstückchen in solchem Serum unter Gegenwart von Komplement eine Schädigung der Hautzellen in ähnlicher Weise stattfinden würde, wie sie beim Hämolyseversuch mit Kaninchenblut in vitro unter Verwendung solcher Sera uns vor Augen tritt.

Wir nahmen deshalb normale Hautstückchen vom Kaninchen, legten sie zum Teil in physiologische Kochsalzlösung, zum Teil in inaktiviertes Antikaninchenziegenserum, zum Teil in das gleiche Serum unter Hinzufügung von Komplement und stellten die betreffenden Versuchsröhrchen $^1/_2$ Stunde in den Brutschrank. Danach wurde zurückimplantiert. Es erfolgte die Anheilung der im inaktivierten wie im reaktivierten Serum gewesenen Hautstückchen genau in der gleichen Weise wie bei den in Kochsalzlösung befindlichen Kontrollstückchen.

Bei dem negativen Ergebnis dieser Versuche wird auf eine Wiedergabe der Versuche im einzelnen verzichtet.

Zusammenfassung.

Durch Transplantation der Haut aktiv immunisierter Kaninchen auf normale läßt sich auch bei dem Empfänger eine Antikörperbildung nachweisen.

Werden Kaninchen aktiv mit Antigen subkutan vorbehandelt, und wird die betreffende Hautregion nach einer gewissen Zeit transplantiert, so bilden sich auch beim Empfänger Antikörper.

Die Antikörperbildung ist intensiver, wenn die Anheilung der transplantierten Haut eine glatte ist.

Werden normale Hautlappen vor der Transplantation mit hämolytischem Antikaninchenserum (Ziege) und Komplement (Meerschweinchen) behandelt, so erleidet die Anheilungsfähigkeit keine Einbuße.

[Aus dem Hygiene-Institut der Universität Greifswald.]

Beziehungen zwischen Antigen und Antikörperbildung. (Der Einfluß des parenteralen Antigendepots auf die Antikörperbildung.)

Nach Versuchen von Dr. **Oshikawa**,
mitgeteilt von **E. Friedberger**.

Mit 11 Kurven im Text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 1. Juni 1921.)

Ueber die Art der Wechselwirkung zwischen Antigen und Organismus, die zur Bildung der spezifischen Antikörper führt, wissen wir absolut nichts Tatsächliches. Die Ehrlichsche Theorie versucht zwar, das Phänomen der intensiven Antikörperbildung bei Zufuhr kleiner Antigenmengen und vor allen Dingen die Spezifität der Antikörper unserem Verständnis näherzubringen, aber wir dürfen doch nie vergessen, daß es sich hier um nichts weiter als eine geistvolle Hypothese freilich von eminenter heuristischer Bedeutung handelt, die zwar mit vielen Tatsachen in Einklang steht, für deren tatsächliche Richtigkeit aber doch auch nicht der geringste Beweis vorliegt. So ist sie im Grunde nichts weiter als eine bildliche Umschreibung der eben erwähnten beiden Tatsachen: 1) der intensiven Antikörperbildung auf kleine Antigenzufuhr und 2) der Spezifität der Antikörper.

Die Theorie von Landsteiner und Reich[1]) sucht die Antikörperbildung auf Grund kolloidchemischer Gesetze zu erklären. Durch die Bildung des Antigens im Innern der Zellen soll das kolloidale Gleichgewicht gestört werden und dadurch zur Wiederherstellung des Gleichgewichts die Neubildung von Substanzen (Antikörper) angeregt werden.

Auch Traube[2]) ist in seiner Resonanztheorie bestrebt, Immunitätserscheinungen physikalisch zu erklären. Er sucht die Antigenwirkung so

---

1) Landsteiner und Reich, Münch. med. Wochenschr., 1903, No. 18, p. 764; Zeitschr. f. Hyg., 1907, p. 213, und Wiener klin. Wochenschr., 1903, No. 47.

2) Traube, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 9, 1911, p. 246.

zu deuten, daß diese die Kolloidbestandteile von Blut und anderen Kolloidlösungen durch Aggregation und Desaggregation physikalisch verändere. Die Spezifität wird auf eine Abstimmung der Oberflächenkräfte zurückgeführt. Die antigenen Molekularkomplexe sollen gewissermaßen nach Art von Kondensatoren elektrisch influenzierend auf die Kolloide des Blutes wirken, diese entgegengesetzt laden, und so in Antikörper verwandeln. „Wie eine Stimmgabel durch Resonanz auf eine andere abgestimmt ist oder eine elektromagnetische Welle Resonanzerscheinungen auslöst, so sehen wir hier aufeinander abgestimmte Moleküle und Molekularkomplexe.“

Auch als Stütze dieser Theorie haben wir keine Tatsachen, sondern bestenfalls Analogien.

Es erscheint auf Grund unserer heutigen Kenntnisse noch immer zwecklos, die Tatsache der Antikörperbildung zu deuten. Im einzelnen tappen wir hier noch völlig im Dunkeln und werden uns zweckmäßiger begnügen, mit möglichst einfachen Vorstellungen das Wesen der Antikörperbildung unserem Verständnis näher zu bringen, und im übrigen uns auf die Gewinnung neuer Tatsachen beschränken, die natürlich wichtiger sind als alle Theorien.

Eine der ältesten an sich recht einleuchtenden Vorstellungen über die Antikörperbildung ist die von R. Pfeiffer begründete Anschauung, daß es sich dabei um eine spezifische Sekretion auf einen spezifischen Reiz handelt. Pfeiffer ging wohl bei dieser Vorstellung von den bekannten Versuchen Pawloffs an Hunden mit Oesophagus- und Magenfistel aus. Wie hier der Schmeckreiz der gekauten Nahrungsmittel, auch wenn sie durch die Oesophagusfistel nach außen gelangen, nicht nur eine Magensaftsekretion hervorruft, sondern die Sekretion eines Magensaftes, der in seiner Zusammensetzung genau den gekauten Speisen entspricht, so soll nach R. Pfeiffer das jeweils parenteral eingespritzte Antigen als Reiz wirken und einen entsprechend abgestimmten Antikörper hervorrufen.

Auch diese Hypothese ist natürlich keine auf Tatsachen sich stützende Erklärung für die Antikörperbildung. Aber sie hat doch den Vorteil, daß es sich dabei um eine ganz allgemeine, nichts weiter präjudizierende Vorstellung handelt.

In erweiterter, umfassenderer Form ist diese Reizhypothese neuerdings von Sahli[1]) zur Erklärung der Antikörperbildung

1) Sahli, Schweiz. med. Wochenschr., 1920, No. 50.

herangezogen worden. In einer interessanten, überaus lesenswerten Arbeit hat der Autor diese Vorstellungen weiter ausgebaut. Nach ihm handelt es sich bei der Antikörperbildung um ein Auftreten im Ueberschuß im Blut selbst, sobald durch die Zufuhr des Antigens die „präformierten Antikörper durch das Antigen gebunden und dadurch für den physiologischen Haushalt des Organismus ausgeschaltet werden". Sahli verlegt den Ort des Verbrauchs der normalen Antikörper nicht in das Zellprotoplasma, sondern lediglich in Blut und Gewebsflüssigkeit. Die Zellen reagieren durch Antikörpersekretion, sobald durch Antigenzufuhr der „Konzentrationsspiegel" der normalen Antikörper im Blut herabgesetzt ist.

Diese Theorie setzt die Präexistenz aller Antikörper im Blut voraus. Die Möglichkeit des normalen Vorhandenseins so vieler Antikörper sieht Sahli in der unendlichen Mannigfaltigkeit rein chemischer, vor allen Dingen aber der kolloidalen Eigenschaften der Eiweißsubstanzen. Das gleiche gilt für Lipoide und Lipoideiweißverbindungen. Die Zahl der präformierten Antikörper ist infolge der ungeheuren Mannigfaltigkeit der Kolloide praktisch unendlich, so daß alle Antigene passende Antikörper finden. Diese spielen im Leben irgendeine unbekannte physiologische Rolle und werden durch eingeführte Antigene gebunden. Auf die dabei entstehenden humoralen Minusschwankungen reagiert der Körper durch Nachsekretion und Uebersekretion. „Die Antikörperbildung ist nichts anderes als eine Form der physiologischen Blutregeneration und Ueberregeneration." Diese Theorie entspricht also in ihrer Fassung bis zu einem gewissen Grade der Pfeiffers, wenn wir als den spezifischen Reiz die durch das Antigen bedingte spezifische Senkung des jeweiligen (spezifischen) normalen Antikörperspiegels annehmen, und als spezifische Sekretion auf diesen Reiz die Sekretion des betreffenden Antikörpers im Ueberschuß.

In der Fassung von Sahli setzt diese Hypothese voraus, daß das Antigen in die Blutbahn resp. die Gewebsflüssigkeit hineingelangt und mit dieser bzw. den dort vorhandenen normalen Antikörpern in direkten Kontakt tritt, während die Vorstellung R. Pfeiffers die Möglichkeit offen läßt, daß das Antigen, auch ohne in die Blutbahn oder Gewebsflüssigkeiten

einzutreten, indirekt etwa auf dem Nervenweg als ein Reiz wirkt und Antikörperbildung auslöst.

Von solchen Vorstellungen ausgehend, wurden auf Veranlassung von Herrn Friedberger Untersuchungen darüber angestellt, wie sich nach parenteraler Zufuhr eines Antigens die Antikörperbildung verhält, wenn das gesamte Antigendepot alsbald wieder beseitigt wird.

Entspricht die Antikörperbildung den Vorstellungen von Sahli, so mußte das längere Vorhandensein des Antigendepots die Antikörperbildung wesentlich beeinflussen, da ja dann die Senkung des Konzentrationsspiegels der normalen Antikörper im Blut mit der fortschreitenden Resorption des Antigens immer stärker werden und dementsprechend auch die regenerative Antikörperproduktion zunehmen mußte. War aber die Vorstellung R. Pfeiffers richtig, so konnte, nachdem der Reiz einmal eingewirkt hatte und die spezifische Sekretion eingeleitet war, diese auch nach Entfernung des lokalen Antigendepots weiter gehen.

Die Versuche wurden so ausgeführt, daß eine bestimmte Menge Antigen in der Spitze des Kaninchenohres deponiert wurde und nach verschiedenen Zeitabschnitten, von der Injektion ab gerechnet, das Kaninchenohr an der Basis abgetrennt wurde.

Es kam nun darauf an, nachzuweisen, wie groß die Zeitabschnitte von der Injektion bis zur Amputation gewählt werden müssen, um gerade noch Antikörperbildung nachweisen zu können, vor allem aber auch, wie die Antikörperkurve nach der Entfernung des Antigendepots im Vergleich zu Kontrollen verlief.

Der Injektionsort wurde an möglichst blutgefäßarmen Stellen der Spitze des Kaninchenohres gewählt. Die örtliche Entfernung der Injektionsstelle von der Amputationsstelle betrug entsprechend der Länge eines Kaninchenohres je nach seiner Größe 10—12 cm. Die Injektion erfolgte entweder subkutan oder intrakutan. Die Amputation wurde in folgender Weise vorgenommen: Die Ohrwurzel wurde möglichst nahe am Kopfansatz mit einer Schieberpinzette abgeklemmt; dann wurde mit einem Scherenschlag das Ohr dicht an der Pinzette abgetrennt. Zur Blutstillung wurde die ganze Schnittfläche mit einem bis

zur Rotglut erhitzten Eisenstab kauterisiert. Nach Lösen der Pinzette stand die Blutung regelmäßig. Die Tiere überstanden die Operation anstandslos.

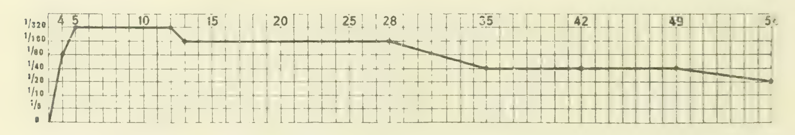
I. Versuchsreihe.

Kaninchen 1—5 von durchschnittlichem Gewicht von 1500 g erhielten in die Ohrspitze je $^1/_2$ Oese bei 60° abgetöteten Proteus X 19 0 Pexkultur[1]) in einem Volumen von 1 ccm Kochsalzlösung.

Nunmehr erfolgte die Amputation des vorbehandelten Ohres: bei Tier No. 2 1 Stunde nach der Injektion; bei Tier No. 3 5 Stunden nach der Injektion; bei Tier No. 4 24 Stunden nach der Injektion; bei Tier No. 5 3 Tage nach der Injektion. Tier No. 1 wurde zur Kontrolle das unbehandelte Ohr amputiert.

Dann wurde Tag für Tag, später in größeren Intervallen, der agglutinatorische Titer sämtlicher Tiere bestimmt. Die entnommenen Blutmengen waren möglichst klein, um Störungen der Antikörperkurve durch den Aderlaß zu vermeiden. Es zeigte sich, daß die erste Agglutininbildung am 3. Tage nach der Injektion, und zwar bei Kaninchen 4 bis 1:5, bei Kaninchen 5, bei dem die Amputation erst nach 3 Tagen erfolgt war, bereits bis 1:40 vorhanden war. Bei Kaninchen 1, bei dem das injizierte Ohr nicht amputiert war, war noch kein Agglutinin nachweisbar.

Vom 4. Tage ab jedoch zeigten sämtliche Tiere Agglutinine in ihrem Serum. Der weitere Verlauf der Agglutininbildung



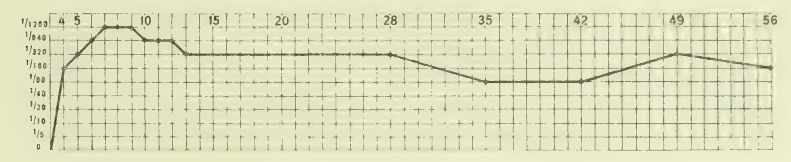
Kurve 1. Kontrolle.

ist aus nebenstehenden Kurven ersichtlich. Auf der Abszisse wurden die Tage, auf der Ordinate die Titerhöhen aufgetragen. Bei der Vergleichung fällt es auf, daß der niedrigste Agglutinationstiter bei Tier 1 vorhanden ist, also bei dem Tier, bei

1) d. h. eine durch Meerschweinchenperitonealpassage virulent gehaltene Kultur.

dem der Injektionsort während der ganzen Dauer der Versuchsperiode nicht entfernt worden war, das also das ganze Antigendepot hatte ausnützen können. Der Titer erreichte am 5. Tage die maximale Höhe von 1:320, sank am 13. Tage auf 1:160, am 35. Tage auf 1:80, und war in der 8. Woche bis auf 1:20 abgesunken.

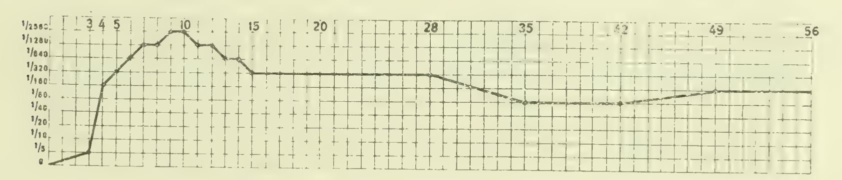
Bei Tier 5, bei dem die Amputation des injizierten Ohres am 3. Tage erfolgt war, war der Titer am 8. Tage 1:1280,



Kurve 2. Kaninchen 5, Amputation nach 3 Tagen.

sank am 11. Tage auf 1:640, am 13. Tage auf 1:320 und im Verlauf der nächsten Wochen langsam bis auf 1:40.

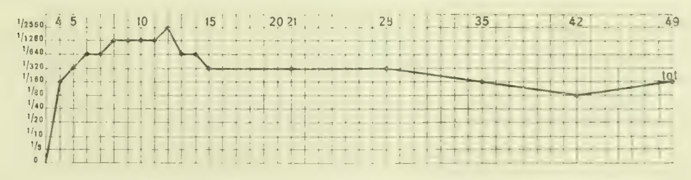
Das Tier 4, bei dem das Injektionsdepot 24 Stunden nach der Anlegung durch Amputation des Ohres entfernt worden war,



Kurve 3. Kaninchen 4, Amputation nach 24 Stunden.

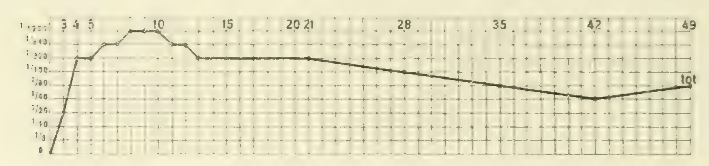
hatte am 9. Tage einen Titer von 1:2560; er sank am 11. Tage auf 1:1280, am 13. auf 1:640, am 15. auf 1:320, und im Verlauf der nächsten Wochen weiter bis auf 1:80.

Bei Tier 3 war die Ohramputation nach 5 Stunden erfolgt. Trotzdem war eine sehr starke Titersteigerung vorhanden, die



Kurve 4. Kaninchen 3, Amputation nach 5 Stunden.

am 12. Tage die maximale Höhe von 1:2560 erreichte. Auch hier Absinken des Titers in den nächsten Wochen auf 1:80. Am auffallendsten war, daß bei dem Tier 2, bei dem die



Kurve 5. Kaninchen 2, Amputation nach 1 Stunde.

Amputation 1 Stunde nach der Injektion stattgefunden hatte, gleichwohl am 8. Tage ein Titer von 1280 da war, der am 11. Tage auf 640, am 13. auf 320 und in den nächsten Wochen weiter auf 1:80 sank.

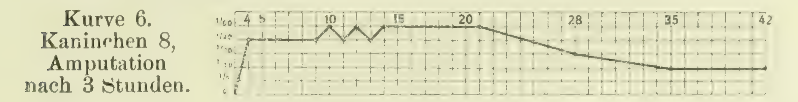
Das Auffallende und völlig Unerwartete in den Ergebnissen dieser Versuche war die unbehinderte Agglutininproduktion, trotz Entfernung des Antigendepots nach einstündigem Verweilen im Tierkörper. Man mußte also annehmen, daß in dieser kurzen Zeit von einer Stunde schon ein ausreichender Reiz für die Antikörperproduktion erfolgt war, oder daß von der relativ großen Antigendosis in dieser Versuchsreihe immerhin doch in der kurzen Zeit ein genügend großer Teil bereits resorbiert war.

II. Versuchsreihe.

In einer zweiten Versuchsreihe haben wir deshalb die Versuchsbedingungen quantitativ anders gestaltet. Hier wurde nicht $^1/_2$, sondern $^1/_{100}$ Oese in das Kaninchenohr eingebracht, und zwar erfolgte die Injektion diesmal nicht sub-, sondern intrakutan. Da wir annehmen können, daß die Resorption in hohem Maße von der Oberfläche des Antigens abhängig ist, daß also bei einer geringen Oberfläche in der Zeiteinheit eine kleinere Antigenmenge resorbiert wird, als wenn dieselbe Antigenmenge mit einer größeren Oberfläche in den Organismus gebracht wird, so haben wir hier die $^1/_{100}$ Oese in einem Volum von 0,1 ccm physiologischer Kochsalzlösung injiziert. Die übrigen Versuchsbedingungen waren die gleichen. Die Tiergewichte betrugen auch hier im Durchschnitt 1500 g.

Die Amputation erfolgte bei Kaninchen 6 nach 30 Minuten, bei Kaninchen 7 nach 1 Stunde, bei Kaninchen 8 nach 3 Stunden.

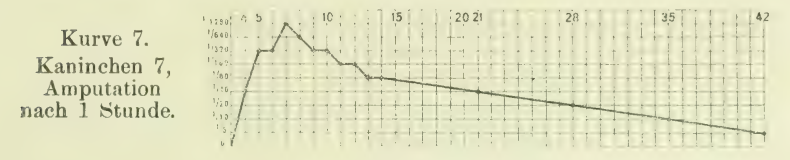
Die nebenstehenden Kurven zeigen wieder den Ablauf der Agglutininbildung. Bei Kaninchen 8 kam es nur zu einer



Kurve 6. Kaninchen 8, Amputation nach 3 Stunden.

Agglutination von 1 : 80, die sich im Verlauf von 10 Tagen herausbildete und sich mit geringen Schwankungen bis zum 21. Tage auf konstanter Höhe hielt, von wo ab ein Absinken bis auf 1 : 10 in den nächsten Wochen erfolgte.

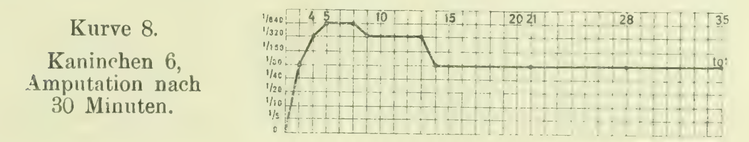
Kaninchen 7, dessen Ohr nach einer Stunde amputiert worden war, zeigte am 7. Tag bereits einen Agglutinationstiter



Kurve 7. Kaninchen 7, Amputation nach 1 Stunde.

von 1 : 1280. Der weitere Verlauf der Agglutininkurve ist ohne Besonderheiten.

Kaninchen 6, bei dem die Amputation schon 30 Minuten nach der Injektion erfolgte, war am 6. Tage schon auf eine



Kurve 8. Kaninchen 6, Amputation nach 30 Minuten.

Titerhöhe von 640 aufgestiegen. Der Titer sank am 9. Tag auf 320, am 14. auf 80 und hielt sich bis zu dem am 35. Tag erfolgten interkurrenten Exitus auf dieser Höhe.

Trotz der geringen Injektionsdosis, trotz des geringen Volumens und trotz der Kürze der Zeit, während der das Injektionsdepot im Körper verblieb, ist also auch hier eine sehr beträchtliche Agglutininbildung erfolgt. Ja wir sehen den im vorigen Versuch bereits erhobenen Befund wiederkehren, daß

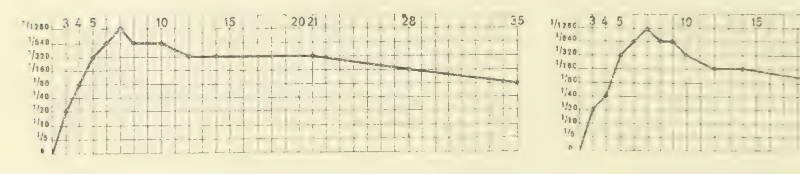
die Agglutininbildung nach rascherer Entfernung des Depots intensiver ist als nach längerem Verweilen. Während wir in der ersten Versuchsreihe bei dem Tier, bei dem das Depot überhaupt nicht entfernt wurde (No. 1), die schlechteste Antikörperbildung haben, sehen wir sie hier wiederum bei dem Tier, bei dem das Depot am längsten im Organismus verblieb.

Wir prüften nun in einer letzten Versuchsreihe, welchen Einfluß eine weitere Verkürzung des Zeitintervalls zwischen der Injektion und der Amputation auf den Verlauf der Agglutininkurve haben würde. Die Injektionsdosis und die übrigen Versuchsbedingungen waren die gleichen wie in den vorigen Versuchen.

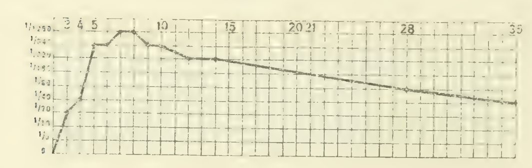
Bei Kaninchen 9 wurde die Amputation 10 Minuten nach der Injektion durchgeführt, bei Kaninchen 10 20 Minuten, bei Kaninchen 11 30 Minuten.

Aus den untenstehenden Kurven ist ersichtlich, daß auch bei Kaninchen 9, bei dem die Amputation also schon

Kurve 9. Kurve 10.



Kurve 11.



Kurve 9. Kaninchen 9, Amputation nach 10 Minuten.

Kurve 10. Kaninchen 10, Amputation nach 20 Minuten.

Kurve 11. Kaninchen 11, Amputation nach 30 Minuten.

10 Minuten nach der Injektion erfolgte, am 7. Tag eine Titerhöhe von 1:1280 erreicht war und daß auch der weitere Verlauf der Agglutinationskurve keine Abweichungen von der der anderen Tiere aufwies, bei denen das Depot längere Zeit im Körper verblieben war.

Betrachten wir diese Versuche in ihrer Gesamtheit, so ergibt sich die Tatsache, daß bereits bei der Entfernung des Antigendepots nach 10 Minuten trotz Injektion einer sehr

kleinen Antigenmenge und trotz intrakutaner Applikation in einem minimalen Volumen die Antikörperbildung mindestens in gleicher Intensität erfolgt und die Antikörper gleich lange im Serum bleiben, als wenn das Antigen nicht entfernt ist.

Wie ist dieses höchst überraschende Ergebnis zu erklären? Es bestehen zunächst zwei Deutungsmöglichkeiten:

1) Innerhalb der Zeit von 10 Minuten findet bereits die vollständige Resorption der maximal mit dem Körper reaktionsfähigen Antigenmenge statt. Das ist schwer verständlich angesichts der geringen Antigendosis von $^1/_{100}$ Oese. Friedberger[1]. sowie Friedberger und Moreschi[2]) haben allerdings gezeigt, daß noch kleinere Dosen, selbst bis zu $^1/_{1000}$ Oese, Antikörperbildung hervorrufen, aber in diesen Mengen doch nur bei intravenöser Einspritzung, wo nach den Untersuchungen von Mertens[3]) ein etwa 50mal höherer Titer beim Kaninchen erzielt wird, als von der Subcutis aus. Aber auch bei der intravenösen Einspritzung fand Friedberger bei $^1/_{500}$ Oese schon bedeutend niedere Titer als bei $^1/_{100}$. Die Dosis von $^1/_{100}$ Oese dürfte also diejenige sein, die den Schwellenwert zur Erreichung einer guten Antikörperbildung von der Subcutis aus darstellt. Innerhalb 10 Minuten, ja selbst innerhalb mehrerer Stunden, kann aber nur ein kleiner Bruchteil von dieser Antigendosis resorbiert sein, jedenfalls erheblich weniger als der 10. Teil. Das ergibt sich auch aus weiteren Versuchen in der vorstehenden Arbeit von Oshikawa, in der gezeigt ist, daß das nach 24 Stunden auf ein anderes Tier transplantierte Hautdepot noch Antikörperbildung hervorrief.

Wollen wir annehmen, daß in der kurzen Zeit von den minimalen dazu unter ungünstigsten Bedingungen injizierten Antigendosen die Antikörperbildung ausgelöst wird, so kommen wir zu dem Ergebnis, daß hier nur infinitesimale Mengen wirksam sein können, oder wir müssen uns die Vorstellung machen, daß im Antigen das eigentlich wirksame Prinzip außerordentlich schnell resorbiert ist, wogegen aber die Transplantationsversuche Oshikawas sprechen, sofern man dabei

---

1) Friedberger, Leyden-Festschrift, 1901, Bd. 2.

2) Friedberger und Moreschi, Centralbl. f. Bakt., Bd. 39, 1905. p. 453.

3) Mertens, Deutsche med. Wochenschr., 1901, No. 24.

nicht annehmen will, daß die transplantierten Zellen unabhängig vom Depot die Antikörperbildung besorgen.

Es ist durchaus möglich, ja es scheint auf Grund unserer bisherigen Vorstellungen natürlich zu sein, daß die Antikörperbildung lediglich durch die in die Blutbahn und an die Antikörperproduktionsstätten gelangten Antigenmengen bedingt ist, so schwierig uns auch diese Vorstellung angesichts der infinitesimalen Mengen erscheint, die hier nur in Betracht kommen können. Aber auch dann bereitet es dem Verständnis Schwierigkeiten, daß das Verweilen des Depots im Organismus nicht eine beträchtlich höhere Antikörperbildung zur Folge gehabt hat. Das müßte doch angesichts der Tatsache, daß eine fortlaufende Resorption von Antigen und Weiterbildung von Antikörpern auf Grund unserer Vorstellungen hätte erfolgen müssen, zu erwarten gewesen sein. Aber wir sehen eher das Gegenteil, daß die Anwesenheit des Depots die Weiterbildung der Antikörper ungünstig beeinflußt.

Die zweite Erklärungsmöglichkeit wäre die, daß entsprechend unseren eingangs gebrachten Ausführungen das Antigen nur als ein Reiz wirkt und daß nach seiner Entfernung die einmal angeregte Sekretion der Antikörper weiter dauert. Dann wäre auch die bessere und stärkere Antikörperbildung nach Entfernung des Depots so zu erklären, daß jetzt keine partielle Absättigung der gebildeten Antikörper durch die vom Depot aus neu resorbierten Antigene erfolgt. Es genügt, kurz auf die Bedeutung hinzuweisen, die derartige Gesichtspunkte für die Praxis der aktiven Immunisierung haben können.

Zusammenfassung.

Die Agglutininbildung nach subkutaner und intrakutaner Einspritzung abgetöteter Bakterien (OX 19 Weil-Felix) findet ungehindert statt, wenn das Antigendepot nach kürzester Zeit (10 Minuten) wieder entfernt wird. Sein längeres Verweilen im Organismus wirkt nicht günstiger, vielleicht sogar etwas schädigend auf die Intensität der Antikörperbildung.

Es werden auf Grund dieser Tatsache Betrachtungen über die Theorie der Antikörperbildung angestellt.

[Aus der II. med. Abteilung des Krankenhauses Wieden in Wien
(Vorstand: Primarius Dozent Dr. Richard Bauer).]

Neue Beobachtungen über die Schutzwirkung des Liquors bei der Mastixreaktion.

Von

Cand. med. **Karl Presser** und Cand. med. **Alfred Weintraub**,
Hospitanten der Abteilung.

Mit 2 Abbildungen im Text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 15. August 1921.)

Von den zur Diagnostik der Cerebrospinalflüssigkeit verwendeten Kolloidreaktionen ist die Mastixreaktion zu Untersuchungen über die Art der im Liquor vorhandenen flockungsverhindernden Schutzstoffe außerordentlich geeignet, denn im Gegensatz zur Langeschen Goldreaktion werden hier die Liquorverdünnungen mit einer die Mastixemulsion von vornherein flockenden NaCl-Lösung angesetzt.

Bekanntlich wird die Mastixsuspension in der Weise bereitet, daß man 1 Teil einer 10-proz. alkoholischen Mastixstammlösung mit 9 Teilen absolutem Alkohol versetzt, die so gewonnene 1-proz. Mastixlösung in die vierfache Menge destillierten Wassers einträgt. Sachs (1) hat gezeigt, daß die Geschwindigkeit, mit der man die alkoholische Mastixlösung in das Wasser einträgt, maßgebend ist für die Kochsalzempfindlichkeit der Mastixsuspension; derart, daß man vom raschen Einblasen der Lösung bis zu langsamem Eintropfenlassen in das Wasser variierend, von den hellsten kochsalzempfindlichsten zu den trübsten und stabilsten Suspensionen gelangen kann. Nach Jacobsthal und Kafka (2) wird der Liquor mit einer Mastix eben flockenden NaCl-Lösung in Verdünnungen von $^1/_4$ bis $^1/_{8000}$ angesetzt. Der normale Liquor schützt Mastix vor Ausflockung, so daß die Kurve des normalen Liquors in dem von Jacobsthal und Kafka angegebenen Schema sich zuerst in der Trübungszone bewegt, um sich dann in den stärkeren Verdünnungen zu stärkster Flockung zu senken, Luetischer Liquor flockt bereits in den ersten Röhrchen.

Es ergeben sich nun folgende Fragen:

1) Welcher Art sind die im Liquor vorhandenen, Mastix vor Ausflockung durch die zur Verwendung gelangende NaCl-

Lösung schützenden Agentien, und sind diese Agentien auch im pathologischen Liquor vorhanden.

2) Welches sind die flockenden Substanzen des luetischen Liquors.

Bereits in seiner ersten Veröffentlichung hat Emanuel (3) darauf hingewiesen, daß schützende und flockende Substanzen voneinander völlig verschieden sind, und daß der pathologische Liquor nicht etwa durch Fehlen der schützenden Substanzen, sondern durch das Vorhandensein eigener fällender Substanzen die positive Reaktion gibt. Analog den Annahmen Langes nimmt Emanuel an, daß es Schutzkolloide, und zwar Eiweißkörper sind, die vor Ausflockung schützen.

Wir stellten nun vorerst Untersuchungen über die im Liquor vorhandenen Schutzstoffe an und versuchten die Eiweißkolloide des Liquors von den übrigen Stoffen zu trennen. Zu diesem Zwecke digerierten wir eine bestimmte Menge Liquor mit chemisch reiner Tierkohle (Carbo anim. purris. Merck) (5 ccm Liquor mit 0,50 g Tierkohle) und verwendeten das so gewonnene Filtrat für unsere Untersuchungen. Tierkohle adsorbiert, wie bekannt, aus verdünnten Eiweißlösungen das Eiweiß völlig, und in der Tat zeigt auch der mit Tierkohle behandelte Liquor negative Trichloressigsäureprobe. Auch Lipoide werden durch Tierkohle gebunden, denn mit Tierkohle behandelter Meinicke-Extrakt erscheint farblos, gibt mit Seren, die mit demselben Extrakt vorher deutlich positiv reagierten, keinerlei Flockung [Bauer und Nyiri (4)]. So konnten wir annehmen, daß durch Tierkohle die im Liquor vorhandenen kolloidalen Substanzen entfernt wurden. Der in oben erwähnter Weise behandelte Liquor schützt nun die Mastixsuspension vor der Ausflockung durch NaCl sogar besser als der normale Liquor. Normale und pathologische Liquores mit Tierkohle behandelt und nach der Methode von Jacobsthal und Kafka angesetzt, ergaben in allen untersuchten Fällen eine Kurve, die dem normalen Liquor entspricht, nur daß die ersten Röhrchen lediglich opaleszent bleiben.

Zur Kontrolle setzten wir physiologische NaCl-Lösung mit Tierkohle an, das Filtrat reagierte neutral und schützte selbstverständlich nicht.

So ergab sich die Folgerung, daß es wohl kaum die kolloidalen Substanzen des Liquors sein können, die die Mastixlösung vor Ausflockung durch NaCl schützen.

Es reagiert nun normaler und pathologischer Liquor, ebenso wie das durch Tierkohle gewonnene Filtrat gegen Phenolphtalein, Methylrot, Methylorange und Lackmus deutlich alkalisch. Unmittelbar nach der Punktion titriert verbraucht 1 ccm Liquor durchschnittlich 0,20 ccm n/10 H_2SO_4 zur Neutralisation. Nach der Gaskettenmethode bestimmt, ergab ein normaler Liquor eine Wasserstoffionenkonzentration p_H = 8,7 ein pathologischer Liquor, ein p_H = 8,6, also ziemlich dieselben Werte (geringes Ueberwiegen der OH-Ionen). Auch die Unterschiede der einzelnen pathologischen und normalen Liquores in ihrer Titrationsalkaleszenz sind nur geringfügig.

Die Vermutung lag daher nahe, daß das Alkali als schützende Substanz in Betracht kommen könne. Wir versetzten je 1 ccm physiologischer NaCl-Lösung tropfenweise mit einer n/20 NaOH. Die so erhaltenen alkalisierten NaCl-Lösungen setzten wir, wie sonst den Liquor, in entsprechenden Verdünnungen nach der Emanuelschen Methode mit einer 1,25-proz. Mastix deutlich flockenden NaCl-Lösung an; das Resultat dieser Versuche ist aus Fig. 1 ersichtlich.

Verd.	A	B	C	D
1/4	T_2	T_1	T_0	T_0
1/8	T_3	T_2	T_1	T_0
1/16	+	T_3	T_2	T_1
1/32	+++	+	T_3	T_3
K	+++	+++	+++	+++

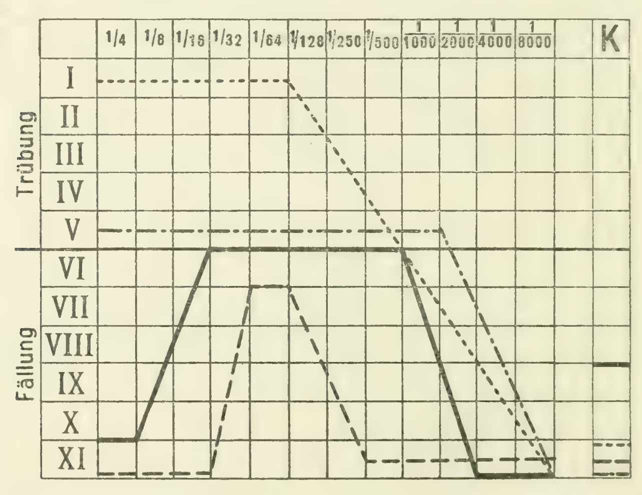
T_0—T_3 Trübungsgrade
+—+++ Fällungsgrade
A 1 ccm 0,75 % NaCl mit 1 Tropfen
B 1 „ „ „ „ 2 „
C 1 „ „ „ „ 3 „
D 1 „ „ „ „ 6 „
einer n/20 NaOH versetzt und wie Liquor in Verdünnungen 1 : 4 verwendet

Fig. 1.

Es vermag also, wie aus diesen Versuchen ersichtlich, Alkali die Mastixsuspension vor Ausflockung durch NaCl zu schützen; dieser Schutz steigt mit zunehmender Alkaleszenz und wird bereits bei einer Alkaleszenz, die noch unter

der des Liquors liegt, ein vollkommener. Bringt man eine physiologische NaCl-Lösung durch NaOH auf die Alkaleszenz des Liquors und setzt sie dann wie Liquor nach Jacobsthal und Kafka mit eben flockender NaCl-Lösung an, so erhält man dieselbe Kurve, wie mit dem durch Behandlung mit Tierkohle erhaltenen Liquorfiltrat. Die gleiche Kurve ergibt sich auch, wenn man z. B. 1 ccm physiologische NaCl-Lösung mit 2 Tropfen 1-proz. Na_2CO_3 versetzt und wie Liquor behandelt. Auch andere Alkalien, sowie auch alkalisch reagierende Salze, z. B. Trinatriumphosphat, ergeben dasselbe Resultat.

Nimmt man nun dem Liquor durch Neutralisieren seine Alkaleszenz, so büßt er auch seine Schutzwirkung völlig ein, er flockt in sämtlichen Röhrchen. Besonders hervorgehoben sei, daß diese „neutralisierten" Liquores niemals sauer reagierten. Interessant ist auch die Wirkung des Alkali auf den Verlauf einer luetischen Kurve. Eine Erhöhung der Alkaleszenz des Liquors um 50 Proz. vermag die deutlich positive Kurve negativ zu machen. Abschwächung der Alkaleszenz läßt die Kurve sich nur in der



——— Kurve des Liquors. —·— Alkal. um 50 Proz. vermehrt.
— — — Alkaleszenz vermindert. - - - - - Tierkohleliquorfiltrat.

Fig. 2. I. B. klinisch Ta. dors. Pandy pos. ++, Nonne Apelt pos. +, Zellen 151/3.

Fällungszone bewegen. Selbst die stärkste Paralysekurve kann durch entsprechenden Alkalizusatz in eine negative verwandelt werden (Fig. 2).

Zur Trennung des kolloidale Substanzen enthaltenden Teiles des Liquors von dem Reste gingen wir noch einen zweiten Weg, den der Dialyse. Zuerst dialysierten wir den Liquor gegen eine gleich große Menge destillierten Wassers. Das auf diese Weise erhaltene Außendialysat reagiert alkalisch, die Alkaleszenz ist etwa halb so groß wie die des normalen Liquors. Auch die feinsten Eiweißproben fallen mit dem Außendialysat negativ aus. Das wie Liquor in Versuchen nach Jacobsthal und Kafka angesetzte Außendialysat zeigt eine Schutzkurve, d. h. die ersten Röhrchen sind völlig ungetrübt, bei den stärkeren Verdünnungen ca. vom 6. bis 7. Röhrchen an beginnt Flockung. Das Innendialysat reagiert noch deutlich alkalisch. Um den Liquor völlig alkalifrei zu machen, dialysierten wir normale und pathologische Liquores gegen große Mengen fließenden und destillierten Wassers. Nun erhielten wir ein gegen oben erwähnte Indikatoren völlig neutral reagierendes Innendialysat. Die abzentrifugierten, im entsprechenden Volumen physiologischer NaCl-Lösung gelösten Globuline zeigten eine durchgehende Fällung, ebenso der wohl größtenteils Albumine enthaltende Rest des Innendialysats. Bringt man das Innendialysat auf den Kochsalzgehalt des Liquors, so lösen sich die ausgefallenen Globuline wieder und man erhält einen seiner Alkaleszenz beraubten, aber im wesentlichen die kolloidalen Substanzen enthaltenden Liquor. Bringt man das aus einem negativen Liquor gewonnene, auf diese Weise behandelte Innendialysat mit eben flockender Kochsalzlösung in absteigende Verdünnungen und versetzt mit Mastix, so tritt in allen Röhrchen durchgehends Flockung auf; das heißt, dieser wohl eiweißhaltige, aber seiner Alkaleszenz beraubte Liquor vermag eine Schutzwirkung nicht mehr zu entfalten. Verdünnt man dieses Innendialysat absteigend mit der letzten nicht trübenden Kochsalzlösung und versetzt mit Mastix, so tritt in den ersten 2 bis 3 Röhrchen eine Trübung auf, die übrigen bleiben opaleszent; das heißt, auch im normalen Liquor sind fällende Substanzen vorhanden, die jetzt nach Entfernung des Alkali zur Geltung kommen. Das

aus einem luetischen Liquor gewonnene Innendialysat zeigt, mit flockender Kochsalzlösung angesetzt, selbstverständlich durchgehends Flockung. Bei Verwendung der letzten nicht trübenden Kochsalzlösung tritt verschieden starke Flockung in den ersten 2 bis 3 Röhrchen auf.

Was die Erklärung der Schutzwirkung des normalen Liquors anbelangt, nimmt Emanuel an, daß es sich hierbei um die Wirkung von Schutzkolloiden, und zwar wahrscheinlich von Eiweißstoffen handelt. Dieser Meinung schließen sich Sachs und Eskuchen (5) an.

Aus unseren Versuchen ergibt sich der zwingende Schluß, daß bei der Liquor-Mastixreaktion Schutzkolloide keine Rolle spielen können. Wir sind der Ansicht, daß die Alkaleszenz des Liquors es ist, die das Ausfallen entladener Teilchen beim Zusammentreffen von NaCl und Mastix verhindert. Nach den neueren Vorstellungen über Bau und Ausflockung der Kolloide [Pauli (6)] wäre daran zu denken, daß es sich um eine chemische Einwirkung auf die Mastixlösung resp. die darin enthaltenen Harzsäuren handelt. Steigt man von der eben flockenden NaCl-Lösung zu höheren Konzentrationen an, so wird der Schutz, den der Liquor und Alkali gewährt, immer unvollkommener, bis es schließlich zur Flockung kommt. Erhöht man die Alkaleszenz, so muß auch die Konzentration der NaCl-Lösung entsprechend erhöht werden, um wieder Flockung zu bekommen. Die Alkaleszenz des normalen Liquors verhindert auch die ausflockende Wirkung der auch im normalen Liquor in geringen Mengen vorhandenen fällenden Eiweißstoffe. Daß solche fällende Stoffe im normalen Liquor allerdings in sehr geringer Menge vorhanden sind, wurde bereits erwähnt und läßt sich auch aus folgender Beobachtung schließen. Während der normale Liquor in den ersten Röhrchen eine ziemlich starke Trübung zeigt, die sich in den nächstfolgenden Röhrchen wieder aufhellt, zeigt das durch Tierkohlebehandlung gewonnene Filtrat, ebenso wie das Außendialysat in den ersten Röhrchen nicht die Spur einer Trübung.

Wenn das im luetischen Liquor vermehrte und wahrscheinlich auch chemisch veränderte Eiweiß den durch das Alkali bedingten Schutz überwiegt, so kommt es zur positiven

Reaktion. Es zeigt sich auch, daß durch Unterdrücken der schützenden Komponente, also durch Erniedrigung der Alkaleszenz, die positive Reaktion verstärkt wird, durch Förderung im Sinne einer Erhöhung der Alkaleszenz aber die positive Reaktion aufgehoben wird. Von diesen beiden Komponenten ist der Alkaleszenzgrad des Liquors als der Schutzfaktor etwas Konstantes, während der Eiweißgehalt als variable Komponente die charakteristische Reaktion ergibt. Was die Alkaleszenz des Liquors betrifft, wird angegeben, daß der Liquor ca. $^1/_2$—$^1/_3$ der Alkaleszenz des Blutes aufweist [Eskuchen, Reichmann (7)]. Dies gilt, wenn man allein die Titrationsalkaleszenz berücksichtigt. Vergleicht man aber die nach der Gaskettenmethode von uns im Liquor gegewonnenen Werte, so zeigt der Liquor ein p_H von 8,6 gegen p_H von 7,5 des Blutes, d. h. der Liquor hat trotz niederer Titrationsalkaleszenz einen höheren Gehalt an freien OH-Ionen als das Blut. Mit Rücksicht auf diesen Befund erschien es uns interessant, die Schutzwirkung von alkalischen Pufferlösungen mit bekanntem OH-Ionengehalt bei der Mastixreaktion zu prüfen. Es wurden daher Salmiak-Ammoniak-Pufferlösungen (Wasserstoffionengehalt OH von $0{,}2 \cdot 10^{-10}$ bis $1{,}02 \cdot 10^{-8}$) mit Mastixlösung und flockender NaCl-Lösung angesetzt, hierbei zeigt sich, daß auch die alkalischen Pufferlösungen die Mastix vor der Ausflockung durch NaCl schützen können, und zwar bei der gleichen CH-Ionenkonzentration und Alkaleszenz, wie sie der Liquor zeigt. Dieser Schutz erstreckt sich noch bis zu einem CH von $0{,}51 \cdot 10^{-8}$, das ist eine Alkaleszenz, die sich mit Indikatoren kaum nachweisen läßt. Die Versuche mit Pufferlösungen verlaufen konform den früher beschriebenen Versuchen. Die Schutzwirkung bei noch geringerem OH und Alkaleszenzgehalt erscheint nicht wunderbar, wenn man bedenkt, daß es sich hier im Gegensatz zum Liquor um eine Lösung mit einem anderen Alkali, nämlich mit freiem Ammoniak handelt.

Zusammenfassung.

1) Der Liquor cerebrospinalis, ob pathologisch oder normal, reagiert alkalisch. Die Alkaleszenz stellt einen ziemlich konstanten Wert dar.

2) Durch Behandlung mit Tierkohle seiner kolloidalen Substanzen beraubt, vermag der Liquor dennoch Mastix vor Ausflockung durch NaCl zu schützen; in gleicher Weise schützt auch das kolloidfreie alkalische Außendialysat des Liquors.

3) Dieser Schutz ist bedingt durch die Alkaleszenz, läßt sich verstärken durch Erhöhung derselben, schwindet bei Neutralisation.

Bei der Kompliziertheit des Problems der flockenden und schützenden Wirkungen des Liquors scheinen uns unsere Versuche, die wichtige und neue Beobachtung zu zeigen, daß neben der bisher angenommenen Schutzwirkung der Liquorkolloide die Alkaleszenz des kolloidfreien Liquors allein genügt, um eine Schutzwirkung gegen Mastixflockungen zu entfalten, wobei man nach den neueren Forschungen an eine chemische Einwirkung des Alkali auf die Mastixharzsäuren (Verseifung) denken könnte.

Literatur.

1) Sachs, Berl. klin. Wochenschr., 1916.
2) Jacobsthal und Kafka, Hamburger Aerztekorrespondenz, 1916; Berl. klin. Wochenschr., 1918.
3) Emanuel, Berl. klin. Wochenschr., 1915.
4) Bauer und Nyiri, demnächst erscheinende Arbeit.
5) Eskuchen, Deutsche Zeitschrift f. Nervenheilkunde, 1918; Lumbalpunktion, 1919.
6) Wo. Pauli, Kolloidzeitschrift, Bd. 28, 1921.
7) Reichmann, Deutsche Zeitschr. f. Nervenheilkunde, Bd. 42.

[Aus der II. med. Abteilung des Krankenhauses Wieden in Wien
(Vorstand: Primarius Doz. Dr. Richard Bauer).]

Zur Theorie und klinischen Verwendbarkeit der Meinicke-Reaktion (III. Modifikation).

Von

Doz. Dr. **R. Bauer** und Dr. **W. Nyiri**,
Vorstand der Abteilung. Assistent der Abteilung.

(Eingegangen bei der Redaktion am 15. August 1921.)

Seitdem Meinicke (1) im Jahre 1917 seine serologischen Methoden zum Nachweis der Lues veröffentlichte, hat eine Reihe von Autoren diese Reaktionen nachgeprüft und an großen Versuchsreihen teils an der Hand der klinischen Daten der untersuchten Fälle, teils durch Vergleich mit anderen serologischen Methoden zur Erkennung der Syphilis, vor allem der Komplementbindungsreaktion nach Wassermann, die Richtigkeit der Meinicke-Reaktionen erwiesen. Von den beiden ersten seiner Reaktionen, die von ihm gleichzeitig bekannt gegeben wurden, ist die Wassermethode (Meinicke I) vorwiegend von theoretischem Interesse und hat sich in der Praxis nicht eingebürgert, während sich die zweizeitige Kochsalzmethode (Meinicke II) als klinisch brauchbar erwies. Bald aber trat auch diese Reaktion vor einer neuen Modifikation Meinickes (2) zurück (Meinicke III oder III. Modifikation), einer serologischen Methode, die durch ihre wesentlich einfachere Versuchsanordnung, vor allem ihre Einzeitigkeit, den klinischen Anforderungen weitaus mehr entspricht und dabei in ihren Ergebnissen den übrigen serologischen Methoden zum Nachweis der Lues gewiß nicht nachsteht.

Trotz dieser allgemein anerkannten guten Brauchbarkeit empfehlen die meisten Autoren nicht die alleinige Verwendung der D.M. zum serologischen Luesnachweis, sondern fordern

die gleichzeitige Anstellung dieser Methode neben der bisher dominierenden Wassermannschen Reaktion. Der Grund hierfür ist wohl darin zu suchen, daß sich diese beiden Reaktionen trotz weitgehender Uebereinstimmung nicht vollkommen decken, sondern sich in ihren positiven Resultaten bis zu einem gewissen Grade gegenseitig ergänzen; vor allem aber darin, daß das Wesen der D.M. bis heute trotz ihrer einfachen Versuchsanordnung ebenso ungeklärt ist, wie die Wassermannsche Reaktion mit ihrer komplizierten Methodik, da sich die wenigen bisherigen Erklärungsversuche als unzulänglich oder nicht stichhaltig erwiesen haben. Es erscheint demnach gerechtfertigt, jeden Versuch, der zur Aufdeckung der Theorie der D.M. beitragen könnte, mitzuteilen. Wir wollen im folgenden zunächst unsere Erfahrungen mit der D.M. schildern und im Anschluß daran die Versuche erörtern, die wir zur Klärung des Wesens dieser Reaktion unternommen haben.

Was die Technik unserer Versuche anbelangt, so sei nur kurz erwähnt, daß wir uns im wesentlichen an die Originalvorschrift Meinickes hielten. Der Extrakt wurde nach der Lesserschen Angabe (3) aus getrocknetem Pferdeherzmuskel bereitet, wobei wir nur insofern von Meinickes Vorschrift abwichen, als wir die Ausschüttelung des gepulverten Herzmuskels 24 Stunden lang vornahmen, während Meinicke dies nur 1 Stunde lang tut. Wir hofften dadurch eine bessere Entfernung der ätherlöslichen Stoffe zu bewirken, von denen der Autor selbst angibt, daß sie störend auf den Ablauf der Reaktion einwirken könnten.

Während Meinicke und mit ihm die meisten Autoren die endgültige Ablesung der Resultate schon 24 Stunden nach Ansetzen des Versuches, also gleich nach Entfernung der Röhrchen aus dem Brutschrank vornehmen, lassen wir unsere Versuchsreihen weitere 48 Stunden bei Zimmertemperatur stehen und sehen die Reaktion erst nach dieser Zeit als beendet an. Wir haben nämlich die Beobachtung gemacht, daß trotz der Verwendung kräftiger Extrakte nach den ersten 24 Stunden nur starke und komplett positive Reaktionen deutliche Flocken aufweisen, während noch nach Ablauf dieser Zeit bis zur 72. Stunde Flockungen bei einer Zahl von Luesseris auftreten können. Als wichtig erscheint uns dabei, daß Reaktionen mit Normalseris auch noch viele Tage nach beendeter D.M. bei Zimmertemperatur frei von Flocken bleiben.

so daß durch die um 2 Tage spätere Ablesung keine unspezifischen Ausschläge vorgetäuscht werden. Der kleine Nachteil der etwas späteren endgültigen Ablesung der Versuchsresultate verschwindet im Vergleich zum praktischen Vorteil, daß auf diese Weise doch vereinzelte Fälle von Lues aufgedeckt werden, die sonst dem Nachweis entgehen würden. Wir notieren die Resultate in der üblichen Weise nach der Stärke der Flocken mit einem, zwei, bzw. drei Kreuzen.

Die Flocken lassen sich in den allermeisten Fällen mit freiem Auge leicht wahrnehmen; nur bei stark lipämischen, hämolytischen und ikterischen Seris ist die Ablesung bisweilen erschwert, in vereinzelten Fällen ohne Lupe makroskopisch unmöglich [Meyeringh (4)]. Für diese Proben hat sich uns das Agglutinoskop von Kuhn und Woithe sehr gut bewährt, während wir es für die Mehrzahl der Versuche als entbehrlich erachten. Nur nebenbei sei erwähnt, daß Watteteilchen, sowie staubförmige Verunreinigungen Flocken vortäuschen können, so daß schon aus diesem Grunde das Verschließen der Röhrchen empfehlenswert erscheint. Wir benützen zu diesem Zwecke Korkpfropfen, da sie nach dem Auskochen neuerlich verwendbar sind.

Meinicke inaktiviert seine Sera 15 Minuten lang bei 55° C, während Epstein und Paul (5) aktive Sera zum Versuche heranziehen und mit diesen bessere Resultate erzielt zu haben glauben. Wir stellten die Versuche jedesmal mit aktiven und inaktivierten Proben an und konnten feststellen, daß beide Arten annähernd den gleichen Wert haben dürften, so daß wir in Zukunft der Einfachheit halber nur aktive Sera zur Untersuchung nehmen wollen.

Da bei der D.M. eigentliche Kontrollen für die einzelnen Faktoren des Versuches fehlen, stellten wir zeitweise improvisierte Kontrollen dadurch an, daß wir einerseits die entsprechende bereitgestellte Extraktverdünnung mit 0,2 ccm phys. Kochsalzlösung statt des Serums als Extraktkontrolle, andererseits Serum mit der dem Extrakt entsprechenden Menge Alkohol (0,1 ccm) und 2 proz. Kochsalzlösung ohne Extrakt als Serum- und Alkoholkontrolle in den Versuch brachten. Alle diese Kontrollen fielen stets negativ aus. Auch wurden von uns Versuchsreihen mit wechselndem

Alkoholzusatz aufgestellt, um die Wirkung des Alkohols auf den Ablauf der Reaktion zu studieren. Dabei zeigte sich, daß erst bei einem Zusatz von 0,23 ccm Alkohol eine Eiweißkoagulation auftrat, während sonst dem Alkohol in kleineren Mengen kein störender Einfluß auf den Ablauf der Reaktion zukommen dürfte.

Wir möchten nun kurz über unsere praktischen Ergebnisse berichten, die wir mit der III. Modifikation der Meinicke-Reaktion erhielten. Es sei vorweggenommen, daß wir ebenso gute Resultate zu verzeichnen haben, wie von anderer Seite berichtet werden [Huebschmann, Schmidt und Pott, Blasius, Pech, Epstein und Paul, Konitzer, Weisbach u. a. (6)]. Bei Zusammenstellung der statistischen Ziffern wurden in erster Linie die klinischen Daten weitgehendst berücksichtigt. Zum Vergleich wurde in einer sehr großen Zahl von Fällen die Wassermannsche Reaktion angestellt, während in einer kleineren Anzahl von Erkrankungen neben der Wassermannschen Reaktion auch noch die Sachs-Georgi-Reaktion (25) herangezogen wurde. In sehr vielen Fällen wurde die Reaktion mindestens 2mal, in einer beträchtlichen Zahl auch mehrere Male hintereinander vorgenommen, sowie auch das Serum vieler Kranker fortlaufend durch viele Monate wiederholt zur Untersuchung kam. Bei den wiederholten Untersuchungen gewannen wir fast immer die gleichen Resultate, nur selten waren quantitative Unterschiede im Ausfall der Proben zu beobachten, die wohl mit den mit diesen Kranken zeitweilig vorgenommenen antiluetischen Kuren in Zusammenhang stehen dürften.

Zur Untersuchung gelangten insgesamt 2800 Proben; von diesen wurde bei 2136 Seris gleichzeitig die Wassermannsche Reaktion angeführt. Der Vergleich zwischen beiden Reaktionen ergibt folgendes Verhalten:

	Anzahl der Fälle	Proz.
WaR. +, D.M. +	457	90,2
WaR. —, D.M. —	1469	
WaR. +, D.M. —	30	1,4
WaR. —, D.M. +	180	8,4
Summe	2136	100,0

Es zeigt sich also vollkommene Uebereinstimmung beider Reaktionen in 90,2 Proz. der Fälle, während Wassermann allein in 1,4 Proz., D.M. allein in 8,4 Proz. positiv ausfällt. Die D.M. ergibt nach dieser Zusammenstellung, wie auch andere Autoren berichten, etwas mehr positive Resultate als Wassermann. Unter diesen allein nach D.M. positiven Fällen finden sich einige, die sich zur Zeit der Untersuchung im Intervall zwischen I. und II. Stadium der Lues befanden, die größere Anzahl jedoch sind Kranke, bei denen die Sekundärperiode bereits vor kürzerer oder längerer Zeit abgelaufen war, die also zum Teil symptomlos waren oder aber rudimentäre Symptome einer Lues III boten. Im Verlaufe der Lues konnten wir bei einzelnen Kranken, bei denen wir ebenfalls stets gleichzeitig D.M. und WaR. untersuchten, feststellen, daß die D.M. bereits einige Zeit vor dem Positivwerden des Wassermann Flockenbildung aufwies; andererseits haben wir auch eine Anzahl von Fällen zu verzeichnen, bei denen während fortlaufender antiluetischer Kuren die Wa.R. negativ wurde und auch weiterhin ständig negativ verblieb, während D.M. noch einige Zeit hindurch konstant ein positives Resultat ergab, um erst später negativ zu werden. Unter den allein nach der Wassermannschen Reaktion positiven 30 Fällen finden sich 21, bei denen die Lues festgestellt war, während sich bei den restlichen 9 Fällen weder anamnestisch noch objektiv ein Anhaltspunkt für eine vorangegangene spezifische Infektion erheben ließ.

Die stärksten Flockungen erhielten wir bei Erkrankungen von exanthematischer Lues, aber auch bei wenig behandelten Kranken, bei denen das zweite Stadium bereits abgeklungen war und die zurzeit symptomlos waren. Bei diesen Blutproben ließ sich die Stärke der Reaktion mühelos durch Titration des Serums ermitteln. Wir nahmen zu diesem Zwecke von 0,2 ccm absteigende Mengen des Serums und ergänzten jede Probe mit phys. Kochsalzlösung auf 0,2 ccm. Zu jedem der Röhrchen wurde dann die übliche Menge entsprechend verdünnten Extraktes zugefügt. Auf diese Weise konnten wir bei vereinzelten luetischen Fällen noch mit 0,0001 ccm Serum positive Ausschläge erzielen. Auch bei dieser Versuchsanordnung erwies sich das aktive und inakti-

vierte Serum als vollkommen gleichwertig. Zur Kontrolle wurden auch Normalsera in derselben Weise zur Titration angesetzt, ergaben aber selbstverständlich stets negatives Resultat.

Wir möchten nicht unerwähnt lassen, daß bei der D.M. auch ältere Blutsera, solange sie nicht offensichtlich in Fäulnis übergegangen sind, ohne Gefahr eines Fehlresultates Verwendung finden können. Es ist dies praktisch von Interesse, da bei der WaR. bekanntlich nur frische oder höchstens wenige Tage alte Sera brauchbare Ergebnisse liefern. Ebenso haben wir im Gegensatz zur WaR. bei Blutseren von Kranken, denen längere Zeit hindurch gewisse Medikamente (Digitalis, Salicylate etc.) verabreicht wurden, keine Fehler im Ausfall der D.M. beobachten können. Eine Bedeutung kommt der D.M. unter anderen auch für jene seltenen Sera zu, die bei der Komplementbindungsreaktion Eigenhemmung aufweisen, bei denen also die WaR. nicht zum Ziele führt. Solche Sera reagieren im D.M. teils positiv, teils negativ und der Ausfall der Flockungsreaktion steht nach unseren bisherigen Erfahrungen mit den klinischen Befunden durchaus im Einklang. Für diese Fälle bildet demnach die D.M. eine sehr willkommene Ergänzung der Wassermannschen Reaktion.

Unter unseren 2800 Fällen finden sich 30, d. i. 1,4 Proz., bei denen bei negativem Ausfall der WaR., hingegen positivem Ergebnis der D.M. klinisch kein sicherer Anhaltspunkt für eine stattgehabte spezifische Infektion gewonnen werden konnte. Wenn auch diese Zahl im Verhältnis zu den ausgezeichneten übrigen Ergebnissen verschwindend klein ist und bei jedem einzelnen dieser Kranken trotz fehlender anamestischer und objektiver Daten eine vorangegangene Lues durchaus nicht auszuschließen ist, so mahnt sie dennoch in der Beurteilung gewisser Resultate zur Vorsicht. Weiß man doch auch von der Wa.R., daß man ihre Ergebnisse bei gewissen Krankheitsgruppen nur mit einer gewissen Vorsicht verwerten kann. Sehen wir zunächst von 7 Fällen von Ulcus molle ab, bei denen D.M. positiv ausfiel und bei denen die Entscheidung darüber, inwieweit der positive Ausfall der Lipoidbindungsreaktion als spezifisch anzusehen ist, kaum möglich erscheint, so finden wir in unseren Protokollen 5 Fälle von Tuberculosis

pulmonum cavernosa, die alle kurz vor dem Tode untersucht wurden und bei denen zum Teil eine terminale akute miliare Aussaat erfolgt war. Auch 2 Fälle von schwerer Sepsis reagierten positiv. Ansonsten fiel die Probe bei folgenden Krankheiten positiv aus: 2 Gonorrhoe, 2 Ulcus cruris, 2mal Emphysema pulmonum und bei je 1 Fall von Trauma der Niere, Nephritis, Eczema mammae, Grippe, Meningitis tbc., Psoriasis, Polyarthritis rheumatica, Gravidität, Balanitis, Carcinoma oesophagi mit Lungengangrän. Wie weit bei den aufgezählten Fällen eine eventuelle Lues latens oder occulta bei der Reaktion mitspielt, läßt sich natürlich nicht entscheiden; es werden sich solche vereinzelte Fälle wahrscheinlich immer finden und mit Rücksicht auf die Unmöglichkeit eine Lues auszuschließen, immer ungeklärt bleiben. Wie schwierig die richtige Deutung dieser Verhältnisse werden kann, lehrt folgender Fall, der an der Abteilung zur Beobachtung kam.

Die 36-jährige Hausgehilfin B. wurde wegen linksseitiger Abducensparese und Kopfschmerzen eingeliefert; Wa.R. fiel im Serum negativ aus, dagegen D.M. schwach positiv. Patientin leugnete auf wiederholtes eindringliches Befragen eine spezifische Infektion; auch die Untersuchung der Lumbalflüssigkeit ergab einen vollkommen normalen Befund. Nach wenigen Tagen antirheumatischer Behandlung schwanden die Beschwerden und die Parese fast vollständig, Patientin wurde auf eigenen Wunsch entlassen und die einzige auf eine Lues hinweisende D.M. stark in ihrem Wert bezweifelt. Etwa einen Monat später starb Patientin plötzlich an den Folgen einer Gehirnblutung und die gerichtlich vorgenommene Obduktion ergab als Todesursache ein geplatztes Aneurysma eines Astes der Arteria cerebri media.

Andererseits scheinen uns die Befunde von positivem D.M. bei Fällen mit hohem Fieber, ausgebreitetem Gewebszerfall oder der Kombination beider, wie z. B. bei Miliartuberkulose und Sepsis, eher unspezifisch zu sein. Diese Vermutung erscheint uns gerechtfertigt, weil ja allgemein bekannt ist, daß auch bei der Wassermannschen Reaktion in diesen Fällen höchste Vorsicht bei der Bewertung der Resultate angezeigt ist, um nicht ein unspezifisches Resultat zu erhalten.

Bei 1137 Fällen unserer Versuchsreihe wurde auf der dermatologischen Abteilung unseres Krankenhauses (Vorstand:

Prim. Dr. Paul Rusch) vergleichsweise die Sachs-Georgi-Reaktion (25) angestellt. Eine vollkommene Uebereinstimmung aller drei serologischen Reaktionen fanden wir in 77 Proz., während in den übrigen 23 Proz. nur ein oder je zwei der Proben positiv ausfielen. Auch aus dieser Uebersicht, deren genauere Wiedergabe zu weit führen würde, geht das früher erwähnte Verhalten der Meinicke-Reaktion hervor. Andererseits deckte auch die Sachs-Georgi-Reaktion einzelne Fälle von Lues auf, die ansonsten dem serologischen Nachweis entgangen wären.

Auch 130 Cerebrospinalflüssigkeiten wurden nach D.M. untersucht und die Resultate waren im Gegensatz zu den Angaben der meisten Autoren, welche D.M. für Liquores überhaupt als unverwendbar erachten, sehr gute. Freilich konnten wir erst durch teilweise Aenderung der Technik diese Erfolge erzielen, ähnlich wie dies seinerzeit von Hauptmann und Hössli (7) für die Wassermannsche Reaktion vorgenommen wurde, indem wir mit jedem Liquor, der aktiv zur Verwendung gelangte, zwei Proben ansetzten; eine mit 0,2 ccm, eine mit 0,5 ccm Liquor. Zu jeder der beiden Proben wurde die übliche Menge verdünnten Extraktes hinzugefügt und weiterhin auch bezüglich der Ablesung wie die Sera behandelt. Dabei zeigte sich bei der größeren Liquormenge eine fast vollständige Uebereinstimmung mit dem Ausfall der WaR., zu der 1 ccm Liquor [bezogen auf Arbeiten mit ganzen Dosen] verwendet wurde; zahlenmäßig in 99,2 Proz. der Liquores, während in einem Fall der D.M. allein positiv ausfiel. Die Flocken traten dabei ebenso deutlich als hellglänzende Körner auf wie bei den Seris; ein auffälliger Unterschied war diesbezüglich zwischen Seris und Liquores nicht vorhanden. Die mit 0,2 ccm Liquor angesetzten Proben waren nur bei jenen Fällen positiv, bei denen auch der titrierte Liquor-Wassermann bei entsprechend geringer Quantität noch positiv ausfiel. Es besteht also nach unserer bisherigen Erfahrung bei Verwendung von Liquores eine nahezu völlige Uebereinstimmung mit der Wassermannschen Reaktion.

Ueberblicken wir unsere praktischen Resultate, die wir mit Hile der D.M. gewonnen haben.

so können wir sagen, daß diese Methoden den übrigen serologischen Methoden zum Nachweis der Lues mindestens ebenbürtig an die Seite gestellt werden kann. Sie ist für Blutsera und Cerebrospinalflüssigkeiten gleich gut anwendbar und übertrifft an Einfachheit der Technik bei weitem die WaR. In manchen Fällen von primärer Lues und Spätlues scheint sie der WaR. überlegen zu sein. Ebenso gibt sie in seltenen Fällen, bei denen die WaR. wegen Eigenhemmung nicht verwendbar ist, eindeutige Resultate. Bei jenen Krankheitsgruppen, mit hohem Fieber, die mit Bacillose oder Gewebszerfall einhergehen, sind ihre positiven Ergebnisse ähnlich der WaR. nur mit einer gewissen Vorsicht zu beurteilen.

Hier muß kurz die Technik der zum Vergleich angestellten Wassermannschen Reaktion Erwähnung finden.

Wir haben uns bei der Anstellung der WaR im wesentlichen noch immer an die Originalvorschrift von Wassermann gehalten, wie sie auch von R. Bauer (8) genau beschrieben wurde. Dabei haben wir selbstverständlich auch alle neueren Angaben und Vorschriften [Müller (9), Mandelbaum (10), Berczeller (11), Lange (12)], die ja in so großer Zahl gemacht wurden, berücksichtigt und auch die im Jahre 1920 erschienene Vorschrift des Wassermannschen Institutes (Volkswohlfahrt No. 13, Berlin) nicht außer acht gelassen.

Von allen diesen neueren Vorschriften schien uns keine einzige geeignet, unsere von jeher guten Resultate entscheidend zu beeinflussen. Am vorteilhaftesten erschien uns die von Mandelbaum geübte Methode zum Zwecke der Vermeidung von Eigenhemmungen (Inaktivieren der bereits mit Kochsalzlösung verdünnten Sera), während wir von der Anstellung der Alkoholkontrollen keinen Vorteil sahen. Das Arbeiten mit halben Komplementdosen (Serum-, Extrakt-, Hämolysin- und Komplementkontrolle), wie sie von Lange und neuerdings in der erwähnten Vorschrift des Reichsgesundheitsamtes angegeben wird, erwies sich im allgemeinen als nicht unzweckmäßig, doch konnten wir auch von dieser Neuerung, besonders, wenn wir die Komplikation des Versuches mit in Rechnung ziehen, keinen ausgesprochenen Vorteil erblicken. Allerdings haben wir bei der Anstellung der WaR. von jeher mit weniger

Schwierigkeiten zu kämpfen, weil wir unsere Sera im eigenen Wirkungskreis unter gleichen Kautelen und nie älter als 24 Stunden zur Untersuchung bringen und auch über die klinische Diagnose stets möglichst orientiert sind.

Haben wir uns, wie aus den angeführten statistischen Daten hervorgeht, überzeugt, daß die D.M. brauchbare praktische Resultate liefert, die der WaR. ebenbürtig an die Seite zu stellen sind, so erhob sich die Frage nach dem Mechanismus dieser Methodik.

Die Ausflockungsreaktion nach Porges und Meier (13) und ihre verschiedenen späteren Modifikationen wurden ursprünglich dadurch erklärt, daß die weniger stabilen Luesglobuline leichter flocken als die Normalglobuline. Aehnliche Vorstellungen hatte man auch von der Meinicke-Reaktion, bis Meinicke (14) selbst zu beweisen versuchte, daß seine Flocken aus einem Gemenge von Globulinen und Lipoiden bestehen. In jüngster Zeit haben verschiedene Autoren [Scheer (15), Niederhoff (16), Epstein und Paul (17), Joel (18)] festgestellt, daß die D.M.-Flocken zum größten Teil alkohol- und ätherlöslich sind und nur so wenig Eiweiß enthalten, daß dasselbe wahrscheinlich nur als Verunreinigung zu betrachten ist.

Wenn auch solche Lösungsversuche nicht durchaus als beweisend gelten können (da ja auch Eiweiß in Verbindung mit Lipoiden alkohollöslich werden kann), so muß doch nach den bisher vorliegenden Untersuchungen als wahrscheinlich gelten, daß die D.M.-Flocken zum größeren Teil vom Extraktanteil herstammen.

In diesem Sinne spricht auch folgender von uns wiederholt unternommener Versuch: Nimmt man ein sehr stark wirksames Luesserum in absteigenden Mengen von 0,2 ccm angefangen, füllt in jedem Röhrchen mit physiologischer Kochsalzlösung auf 0,2 ccm auf und stellt mit diesen variablen Serumquantitäten die D.M. an, so zeigt sich, daß die Reaktion bis zu einer Serummenge von 0,0001 ccm positiv ausfällt. Vergleicht man nun die Flockenbildung in den einzelnen positiven Röhrchen, so zeigt sich, daß mit Ausnahme der letzten zwei Proben, die den Uebergang zu der negativen Reaktion bilden, alle Röhrchen einen gleich reichlichen Niederschlag aufweisen. Versetzt man das gleiche starke Luesserum mit fallenden Mengen der mit 2 Proz. Kochsalz bereiteten Extraktverdünnung, so zwar, daß zu je 0,2 ccm Serum 0,8,

0,7, ... bis 0,1 ccm Extraktverdünnungen hinzugefügt werden, so nimmt mit absteigenden Extraktmengen trotz gleicher Serummenge auch die Zahl der Flocken deutlich ab. Variiert man schließlich das gegenseitige Mengenverhältnis zwischen Extrakt und Serum noch derart, daß zu der im Original-Meinicke III verwendeten Extraktmenge von je 0,8 ccm, Serummengen über 0,2 ccm, also relativ zu große Quantitäten zugesetzt werden, so bleibt die Zahl der Flocken dennoch die gleiche wie in der Anordnung des Originalversuches von *Meinicke*. Aus den angeführten Versuchsreihen geht konform hervor, daß *die Masse des Niederschlages mit Aenderung der Extraktmenge variiert, während Aenderung der Serummenge und damit Schwankungen des Eiweißgehaltes in beträchtlicher Breite von keinerlei Einfluß auf die Zahl der Flocken sind.*

Zu der gleichen Ueberlegung führt uns der Vergleich der Flockenbildungen zwischen starken luetischen Seren und starken luetischen Cerebrospinalflüssigkeiten. Das Verhältnis der Eiweißmengen des Liquors zu denen des Serums beträgt selbst bei hochgradig luetisch veränderten Liquores mindestens ca. 1 : 40 (entsprechend 2 Prom. und 80 Prom. Eiweiß). Geht man demgemäß von der Annahme aus, daß die Hauptmasse der D.M.-Flocken aus dem Eiweiß des zu untersuchenden Mediums stammt, so sollte man im Serum-*Meinicke* relativ stärkere Niederschlagsbildung erwarten als im Liquor-*Meinicke*. Dies ist jedoch nicht der Fall; *Serum und Liquor bewirken unter Anwendung der gleichen Extraktmengen trotz großer Differenzen des Eiweißgehaltes annähernd gleich starke Flockenbildung.*

Zu ähnlichen Ueberlegungen führen uns Resultate, die wir bei wiederholter Anwendung ein und derselben Extraktprobe mit verschiedenen Seris gewonnen haben. Wurde D.M.-Proben, bei denen die Reaktion negativ ausfiel, neuerlich 0,2 ccm Normalserum hinzugefügt, so blieb die Reaktion auch nach weiterem 24-stündigem Belassen der Proben im Brutschrank frei von Flockung; diese Prozedur ließ sich mit demselben Röhrchen beliebige Male mit dem gleichen Resultat

wiederholen und der Extrakt blieb weiterhin wirksam; es konnte noch nach vielen Tagen durch schließlichen Zusatz luetischen Serums seine Flockungsfähigkeit erwiesen werden. Anders fiel das Ergebnis bei Verwendung von Luesseren aus. Wurde ein Meinicke-Röhrchen mit positivem Resultat von dem Niederschlag befreit, und die so erhaltene von Flocken freie Restflüssigkeit neuerlich mit 0,2 ccm Luesserum versetzt, so traten nach abermaligem Verweilen im Brutschrank durch 24 Stunden keine Flocken mehr auf. Wohl aber kam es zu reichlicher Flockenbildung, wenn man zu dem auf die geschilderte Weise bereiteten flockenfreien Meinicke-Rest neuerlich Extrakt in der üblichen Verdünnung und Quantität zusetzte. Es ergibt sich demnach, daß sich der Extrakt im positiven Versuch nach Entfernung der Flocken als erschöpft erweist, während das Luesserum noch reichlich reaktionsfähige Substanzen enthält. Im negativen Versuch hingegen behält der Extrakt seine Wirksamkeit auch nach mehrtägigem Stehen mit Normalserum der Hauptsache nach bei. Diese Versuche, die unserer Auffassung der D.M. vollkommen entsprechen, stehen im Gegensatz zu den Beobachtungen Meinickes (14).

Ein nicht beweisendes, aber interessantes Detail über die Natur des Niederschlages mag hier noch Erwähnung finden. Bei der Verbrennung des scharf zentrifugierten und gewaschenen D.M.-Niederschlages entwickelt sich ein deutlicher Acroleingeruch, der sich von dem Geruch von verbranntem Eiweiß deutlich unterscheiden läßt, was wiederum für die Anwesenheit von Lipoiden im Niederschlag spricht.

Alle diese Versuche machen es wahrscheinlich, daß der größere Teil des Niederschlages bei der D.M. im wesentlichen aus Lipoiden besteht. Inwieweit auch Eiweiß an der Niederschlagbildung beteiligt ist, muß erst genauer studiert werden.

Nachdem nun wahrscheinlich gemacht war, daß bei der D.M. der Extrakt durch das Serum zur Flockung gebracht wird, suchten wir das Wesen der Reaktion auf die Weise näher zu studieren, daß wir die Methoden, die in der Kolloidchemie bei Flockungsreaktionen üblich sind, zur Anwendung

brachten. Zu diesem Zwecke wurden zunächst die elektrischen Ladungen der einzelnen Teile untersucht [1]).

Wir brachten den entsprechend verdünnten Extrakt in den Ueberführungsapparat von Landsteiner und Pauli (19). Als Elektrolytlösung, die zur Leitung des Stromes zwischen den beiden Platinelektroden und der zu untersuchenden Flüssigkeit Verwendung findet, konnten wir jedoch die üblichen wässerigen Salzlösungen nicht benützen, da wegen der Differenz der spezifischen Gewichte dieser und des alkoholischen Extraktes sofort eine Vermischung der Substanzen eintrat. Um dies zu vermeiden, wurde daher der Extrakt mit einer spezifisch leichteren alkoholisch-wässerigen Salzlösung als Leitflüssigkeit überschichtet und der elektrische Strom durchgeschickt. Doch ließ sich selbst nach einer Versuchsdauer von mehreren Stunden im Gegensatz zu den Angaben von Epstein und Paul (17) keinerlei merkliche Wanderung der trüben Lipoidteilchen wahrnehmen.

Da wir auf diese Weise keine einseitige elektrische Ladung der Extraktbestandteile feststellen konnten, so betraten wir hierzu den zweiten allgemein üblichen Weg, nämlich den der Bestimmung des isoelektrischen Punktes. Durch geeignete saure bzw. alkalische Pufferlösungen sollte das Flockungsoptimum des Extraktes ermittelt werden, um daraus einen Schluß auf seinen Ladungssinn und allenfalls auch auf seine Ladungsstärke ziehen zu können. Es wurden zu je einer Reihe von Röhrchen, welche die im Original-D.M. übliche Menge von 0,8 ccm der Extraktverdünnung enthielten, saure, bzw. alkalische Pufferlösungen mit steigender und fallender H-Ionenkonzentration hinzugefügt. Die sauren Pufferlösungen bestanden aus einem Essigsäure/Acetat-Gemisch; das Mengenverhältnis der beiden Bestandteile variierte von 1 : 64 bis 20 : 1 : die alkalische aus einem Ammoniak/Ammoniumchlorid-Gemisch im gleichen Verhältnis, so daß die H-Ionen-Konzentration ca. zwischen $p_H = -3{,}5$ und $p_H = -11{,}1$ variierte. Aus der folgenden Tabelle ist das Ergebnis beider Versuchsreihen ersichtlich (Tabelle I).

---

1) Wir möchten bei dieser Gelegenheit darauf hinweisen, daß alle unsere Versuche wiederholt angestellt wurden und immer ein gleichsinniges Resultat ergaben.

Tabelle I.

Essigsäure Acetat-Gemisch (n/10)	0/1	1/48	1/32	1/16	1/8	1/4	1/2	3/4	1/1	2/1	4/1	6/1	8/1	10/1	12/1	14/1	16/1	18/1	20/1	0
je 0,8 ccm Extraktverdünnung	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+—	+—	+—	—	+—	—	—	—	—

Ammoniak/NH_4Cl-Gemisch (n/10)	0/1	1/64	1/32	1/16	1/8	1/4	1/2	3/4	1/1	2/1	4/1	6/1	8/1	10/1	12/1	14/1	16/1	18/1	20/1	0
je 0,8 ccm Extraktverdünnung	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Zunächst zeigte sich, daß in keinem Röhrchen eine kräftige Flockung auftritt, die an einen stärker positiven Original-D.M. erinnern würde. Während aber die alkalische Seite des Versuches vollkommen ungeflockt bleibt, ist im sauren Medium in ca. 5 Röhrchen entsprechend einer H^+-Konzentration von $p_H = -3,5$ bis -4 eine schwache Flockung bemerkbar, die jedoch in keiner Eprouvette ein Maximum erreicht. Der Versuch ergibt demnach keinen einwandfreien isoelektrischen Punkt für die kolloiden Extraktteilchen und daher auch keinen sicheren Anhaltspunkt für die Ladung der genannten Teilchen. Immerhin läßt sich vielleicht aus der auf der sauren Seite aufgetretenen geringgradigen Körnchenbildung vermuten, daß die Lipoide des Extraktes eine schwach negative elektrische Ladung aufweisen.

Weiterhin wurde durch Bestimmung des isoelektrischen Punktes der elektrische Ladungszustand von Blutseren untersucht und dabei auf eventuelle diesbezügliche Differenzen zwischen normalen und luetischen Seris besonderes Augenmerk gerichtet. Die Methodik war die von Pauli, Matula und Sameč (20) angewandte, d. h. die Sera wurden, wie vorhin der Extrakt, mit sauren und alkalischen Pufferlösungen versetzt und das Flockungsoptimum durch Alkoholzusatz gesucht. Zu je 1 ccm einer ca. 1 Proz. Eiweiß enthaltenden Serumverdünnung wurden saure Pufferlösungen mit einer H^+-Konzentration zwischen $p_H = -4,7$ bis $p_H = -6,5$ zugesetzt und jedes Röhrchen mit 1 ccm 95 proz. Alkohol versetzt. Dabei zeigte sich, daß der isoelektrische Punkt des Serumeiweißes (Flockungsoptimum) auf der sauren Seite liegt [Pauli (21)] und sowohl bei normalen wie bei luetischen Seris einem

Milieu von ca. $p_H = -4$ entspricht. Tabelle II [1]) gibt die saure Seite der Versuchsreihe wieder.

Tabelle II.

Essigsäure/Acetat-Gemisch (n/10)	0	0/1	1/64	1/32	1/16	1/12	1/8	1/4	1/2	3/4
je 2 ccm Luesserum verdünnt	±	±	±	±	±	±	±	±	±±	±±
je 2 ccm Normalserum verdünnt	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±

Essigsäure/Acetat Gemisch (n/10)	1/1	3/2	2/1	3/1	4/1	6/1	8/1	10/1	12/1	1/0
je 2 ccm Luesserum verdünnt	±±±	±±±	+++	++	++	++	++	++	++	++
je 2 ccm Normalserum verdünnt	±±	±±±	+++	++	++	++	++	++	++	±±±

Aus diesen Versuchen geht also hervor, daß **bei den Eiweißteilchen der Lues- und Normalsera eine schwach negative elektrische Ladung infolge größerer Säuredissoziation überwiegt und das in dieser Hinsicht kein Unterschied zwischen Lues- und Normalserum besteht.**

Haben wir uns auf diese Weise in Vorversuchen ein Bild darüber verschafft, wie Aenderungen des Säuregrades auf den Extrakt, sowie auf das Blutserum einwirken, so galt es in den nächsten Versuchsreihen zu zeigen, welchen Einfluß veränderte Aziditätsverhältnisse auf die D.M. selbst ausüben würden. Es wurde daher die D.M. in gewöhnlicher Weise mit Normal- und Luesseris angesetzt und in geeigneter Weise die Pufferlösungen in steigender Menge zugefügt, und zwar wurden zu 2 positiven Versuchsreihen je saure und alkalische Pufferlösungen zugesetzt und ebenso zu 2 negativen Versuchsreihen. Die Pufferlösungen bestanden aus denselben Gemischen, wie bereits weiter oben erwähnt wurde.

Wie aus Tabelle III hervorgeht, verliefen die Versuche so, daß bis zu dem früher ermittelten isoelektrischen Punkt,

---

1) ± Opaleszenz, ±± leichte Trübung, ±±± stärkere Trübung. Die Zeichen ++, +++ bedeuten sichtbare Flockenbildung bei gleicher Undurchsichtigkeit.

Tabelle III. (D.M. mit Pufferlösungen.)

Essigsäure Acetat-Gemisch (n/10)	0/1	1/64	1/32	1/16	1/8	1/4	1/2	3/4	1/1	2/1
je 0,2 ccm Luesserum + Extrakt	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	1) +++
je 0,2 ccm Normalserum + Extrakt	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Essigsäure/Acetat-Gemisch (n/10)	4/1	6/1	8/1	10/1	12/1	14/1	16/1	18/1	20/1	0
je 0,2 ccm Luesserum + Extrakt	1) +++	2) ++	k	k	k	k	k	k	k	+++
je 0,2 ccm Normalserum + Extrakt	1) —	1) —	2) —	k	k	k	k	k	k	—

Ammon./NH_4Cl-Gemisch (n/10)	0/1	1/64	1/32	1/16	1/8	1/4	1/2	3/4	1/1	2/1
je 0,2 ccm Luesserum + Extrakt	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
je 0,2 ccm Normalserum + Extrakt	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Ammon./NH_4Cl-Gemisch (n/10)	4/1	6/1	8/1	10/1	12/1	14/1	16/1	18/1	20/1	0
je 0,2 ccm Luesserum + Extrakt	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
je 0,2 ccm Normalserum + Extrakt	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

1) Trübung, 2) starke Trübung, k Koagulation.

von dem an Eiweißflockung auftrat, die Reaktion ganz unverändert blieb. Das positive Serum zeigt bei Zusatz von saurer Pufferlösung zunächst ganz gleiche Reaktion wie sonst. vom isoelektrischen Punkt des Eiweißes an dichte Eiweißflockung. Mit der alkalischen Pufferlösung versetzt bis zu p_H = —10,7 ändert sich die D.M. überhaupt nicht. Aus diesem Versuch geht hervor, daß die positive D.M. auch auf der sauren Seite des Versuches unverändert verläuft. Dort, wo der isoelektrische Punkt des Eiweißes liegt, wird sie durch Eiweißflockung verdeckt. Der Versuch mit der alkalischen Pufferlösung zeigt, daß vermehrte negative Ladung des Eiweißmediums die Flocken-

bildung unverändert läßt. Die Versuche mit Normalserum zeigen konform, daß die Hinzufügung negativer Ladungen die negative Reaktion selbstverständlich negativ läßt, und daß die Hinzufügung positiver Ladungen nicht imstande ist, eine Ausflockung herbeizuführen.

Zur weiteren Bekräftigung dieser sauren und alkalischen Pufferversuche haben wir noch die D.M. unter dem Einfluß von reiner Säure und Lauge wiederholt angestellt, und zwar von den minimalsten Mengen angefangen ansteigend bis zu sehr kräftigen, das Eiweiß schon denaturierenden Mengen. Diese Versuche (Tabelle IV) geben ganz eindeutige Resultate.

Tabelle IV. (D.M. mit reiner Säure und Lauge.)

Salzsäure Tropfen	n/100					n/100				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
D.M. mit Luesserum	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
D.M. mit Normalserum	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Salzsäure Tropfen	n/10					n/1					0
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
D.M. mit Luesserum	+++	[1]) +++	[2]) ++	k	k	k	k	k	k	k	+++
D.M. mit Normalserum	—	[1]) —	[1]) k	k	k	k	k	k	k	k	—

Natronlauge Tropfen	n/1000					n/100				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
D.M. mit Luesserum	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
D.M. mit Normalserum	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Natronlauge Tropfen	n/10					n/1					0
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
D.M. mit Luesserum	+++	+++	+++	+++	—	s +	s +	s +	s +	s +	+++
D.M. mit Normalserum	—	—	—	—	—	s +	s +	s +	s +	s +	—

1) Trübung, 2) starke Trübung, k Koagulation, s Serum entfärbt, seifenähnliches Medium.

Es gelingt weder ein positives Serum durch Zusatz von Lauge negativ zu machen, noch ist es uns jemals gelungen, in einem negativen Serum durch Säurezusatz eine positive D.M. auszulösen. Der Säure- und Laugezusatz betrug von einem Tropfen n/1000 Lösung bis hinauf zu 5 Tropfen n/1 Lösung, so daß sich der D.M.-Versuch in einem Milieu von n/20000 bis n/5 vollzog. Die Reaktion verlief bei diesem Versuch bis zu einem Milieu von ungefähr n/80 Säure ganz unverändert, darüber hinaus wurde das Eiweiß gefällt (deutlich koaguliert, bei noch stärkerem Säurezusatz gelöst). Beim Laugenversuch mit dem positiven Serum zeigte sich komplette Flockung bis zu einem Milieu von n/40 Lauge, erst darüber hinaus wurde der Versuch undeutlich (Auftreten gröberer Flocken in seifenähnlichem Medium sowohl bei positivem wie negativem Serum).

Die eben angeführten Versuche sowohl mit saurer und alkalischer Pufferlösung, als auch mit reiner Säure und Lauge zeigen, daß im Gegensatz zur Wassermannschen Probe [Sachs und Altmann (22)] die Reaktion des Milieus innerhalb gewisser mittlerer Breiten auf den Ablauf der Meinicke-Reaktion III und auf die spezifische Flockenbildung keinerlei Einfluß ausüben (für die Sachs-Georgi-Reaktion scheinen die Verhältnisse nach Neukirch (23) auch etwas anders zu liegen). Es erscheint demnach wahrscheinlich, daß ein allfälliger Ausgleich elektrischer Ladungen beim Zusammentreten der Teilchen keine ursächliche Rolle für das Zustandekommen der Flockung spielen dürfte. Sprachen schon die Vorversuche durch Klarlegung der negativen Ladung der Teilchen luetischer und normaler Sera einerseits, des Extraktes andererseits dafür, daß diese beiden Bestandteile der Meinicke-Reaktion nicht infolge elektrischer Ladungsverschiedenheit aufeinander einwirken könnten, so ist in den zuletzt besprochenen Versuchen kein Anhaltspunkt dafür zu finden, daß im Ladungsausgleich der Teilchen und der D. M. überhaupt ein kausaler Zusammenhang besteht.

Einen weiteren Beweis in dieser Hinsicht liefern uns Werte über die H^+-Konzentrationen, die wir mit Hilfe der

Gaskettenmethode gewonnen haben. Wir setzten die D.M. mit Normal- bzw. Luesseris vorschriftsgemäß an und bestimmten die H^+-Konzentration sowohl unmittelbar nach Ansetzen des Versuches als auch nach Beendigung der Reaktion. Als Kontrollobjekt für die Richtigkeit der Versuchsanordnung wurde eine Probe statt mit Extrakt nur mit der entsprechenden Menge 95-proz. Alkohols, sonst aber unter den gleichen Kautelen angesetzt. Diese Kontrolle gab vollkommen übereinstimmende Werte. Tabelle V gibt unsere Resultate wieder.

Tabelle V.

	p_H zu Beginn	p_H zu Ende
Luesserum HK. inaktiv	8,49	8.57
Normalserum KA. inaktiv	8,35	8,45
Luesserum BA. aktiv	8.53	8.66
Normalserum IJ. aktiv	8,30	8,42
Kontrolle ohne Extrakt	8,28	

Es geht aus diesen Versuchen hervor, daß der Gehalt an freien H^+ im Gegensatz zu den Angaben Konitzers (24) in den Proben mit Lues- und Normalseris praktisch der gleiche ist und sich in beiden Fällen im Verlaufe des Versuches nicht ändert. Die Reaktion spielt sich ungeachtet der Herkunft des Serums bei einem p_H von ca. 8,4 ab.

Was nun die Rolle der Salzkonzentration anbelangt, bei der die D.M. stattfindet, so haben wir in Ergänzung der diesbezüglichen Versuche Meinickes (14) folgende Erfahrungen gemacht: Verdünnt man den Extrakt mit der siebenfachen Menge verschieden konzentrierter Kochsalzlösungen und setzt damit die D.M. an, so läßt sich, wie aus Tabelle VI hervorgeht, feststellen, daß bei positiver Reaktion zwar das

Tabelle VI. D.M. mit wechselnden NaCl-Konzentrationen.

NaCl-Konzentration %	0	1/4	1/2	1	2	3	4	7	10	15	20
Luesserum	+	+	+	++	+++	+++ [1]	+++ [1]	+++ [1]	++ [1]	++ [1]	++ [1]
Normalserum	+++	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—

1) Etwas weniger reichlich Flocken.

Flockungsoptimum des Extraktes bei 2 Proz. Kochsalzgehalt stattfindet, daß aber auch bei höheren Salzkonzentrationen bis zu 10 Proz. die Probe fast ebenso gut ausfällt, nur ist die Zahl der Flocken vielleicht etwas spärlicher. Erst bei noch höherer Konzentration der Kochsalzlösung wird die Reaktion deutlich, aber auch nicht stark abgeschwächt. Unter den gleichen Umständen verhält sich das Normalserum stets negativ. Versucht man zu D.M. Kochsalzkonzentrationen unter 2 Proz., so bleibt bei 1 Proz. die Reaktion mit Normalserum noch negativ, wird aber mit Luesserum schon wesentlich schwächer. Bei noch größeren Verdünnungen treten unbekümmert um die Art des Serums stets Flocken auf, während es bei Verdünnung des Extraktes mit der siebenfachen Menge Wasser statt Kochsalz bei der Probe mit dem Normalserum zu stärkerer Flockenbildung kommt (Meinicke I) (1).

Läßt man den mit der siebenfachen Menge Kochsalzlösung verdünnten Extrakt 24 Stunden bei 37° stehen, so zeigt sich (Tabelle VII), daß eine deutliche Flockung des Extraktes erst durch 20-proz. Kochsalzlösung bewirkt wird, obzwar auch diese Flockung nur einem schwachpositiven Resultat des Original-D.M. gleichzusetzen ist. Auch weitere Beobachtung dieser Versuchsreihe durch mehrere Tage ruft keine Aenderung der Flockungsverhältnisse hervor.

Tabelle VII.

NaCl-Konzentration Proz.	0[1]	0,25	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	20
je 0,1 Extrakt mit 0,05 Wasser	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+—	+—	+

Der Umstand, daß einerseits Kochsalzlösungen von so verschiedener Konzentration nicht flockend auf den Extrakt wirken, andererseits die bei Kochsalzkonzentrationen beträchtlicher Differenz ausgeführten D.M.-Reaktionen in ihrem Ablauf keinen wesentlichen Unterschied aufweisen, spricht dafür, daß der Extrakt flockenden Einflüssen weniger unterworfen zu sein scheint, als dies allgemein angenommen wurde; daß man

1) 0,8 ccm H_2O statt Kochsalz als Kontrolle.

daher kaum von einer „Labilität“ des mit Kochsalzlösung versetzten Extraktes sprechen kann. Den Autoren aber, die eine „Schutzkraft“ des Normalserums gegen die Ausflockung des Extraktes annehmen, möchten wir entgegenhalten, daß die zum Vergleich dieser Erscheinung herangezogene Flockung des Extraktes durch 2-proz. Kochsalzlösung nicht besteht. Wir möchten betonen, daß der mit der siebenfachen Menge 2-proz. Kochsalzlösung versetzte Extrakt nach 24-stündiger Brutschranktemperatur noch nach vielen Tagen vollkommen ungeflockt bleibt und seine richtige „Aufhellung“ nach Meinicke (2) beibehält.

Ersetzt man das Kochsalz durch äquivalente Mengen anderer Salze, so zeigt sich ein verschiedenes Verhalten (Tabelle VIII).

Tabelle VIII. D.M. in verschiedenem Salzmilieu.

Aequivalente Salzlösungen	NH_4Cl 1,82 Proz.	CH_3COONa 4,65 Proz.	$(NH_4)_2SO_4$ 2,26 Proz.	Na_2SO_4 5,5 Proz.	$CaCl_2$ 3,74 Proz.	$MgSO_4$ 4,21 Proz.	NaCl 2 Proz.
Normalserum PE.	—	—	—	—	—	+	—
„ KF.	+—	—	—?	—?	—	++	—
„ BF.	+—	—	—	—	—	+	—
Luesserum GL.	+++	+—	+++	++[1])	—	+++	+++
„ RA.	+++	+—	+++	++[1])	+—	+++	+++
„ SB.	+++	++	+++	+++	++[1])	+++	+++

Dem Kochsalz am nächsten scheint das Ammoniumsulfat in seinem Verhältnis zum Extrakt zu sein. Natriumazetat, Natriumsulfat, Bariumchlorid und Kalziumchlorid schwächen, Magnesiumsulfat verstärkt die Flockbarkeit der Extraktlipoide. Auch aus diesen Versuchen geht konform hervor, daß die Salze keine stark flockende Wirkung auf den Extrakt ausüben; bei Salzen mit zweiwertigen Metallionen (Ca, Ba), bei denen man eine stärker flockende Wirkung erwarten sollte, ist zum Teil das Gegenteil der Fall.

1) Spärliche grobe Flocken.

Zusammenfassung.

Die Flockungsreaktion nach Meinicke (D.M.) ist eine praktisch sehr gut verwendbare Methode zum Nachweis der Lues im Blutserum und Liquor cerebrospinalis. Sie ist technisch wesentlich einfacher als die Wassermannsche Reaktion und ist dieser mindestens gleichwertig.

Es erscheint wahrscheinlich, daß der größere Teil der bei der Reaktion auftretenden Flocken aus den Lipoiden des Extraktes stammt. Der Extrakt erweist sich im positiven Versuch nach Entfernung der Flocken als erschöpft, während das Luesserum noch reaktionsfähige Stoffe enthält. Im negativen Versuch bleibt die Wirksamkeit der Extraktbestandteile erhalten. Die Lipoidteilchen des Extraktes dürften schwach elektronegativ geladen sein.

Die elektrische Ladung des Serumeiweißes ist überwiegend negativ (Pauli); ein Unterschied in der Art und Stärke der Ladung zwischen normalen und luetischen Blutseren besteht nicht.

Die Flockenbildung bei der D.M. steht in keinem ursächlichen Zusammenhang mit einem eventuellen Ausgleich elektrischer Ladungen der einzelnen Komponenten der Reaktion. Demgemäß ändert sich auch die H^+-Konzentration während des Reaktionsablaufes nicht und gibt bei Verwendung normaler und luetischer Sera identische Werte.

Die D.M. ist von dem Säuregrad des Milieus in beträchtlicher mittlerer Breite unabhängig. Die Reaktion läuft im sauren Medium ebenso deutlich und vollständig ab, wie bei alkalischer Reaktion.

Bei Verdünnung des Extraktes mit 2-proz. Kochsalzlösung ist das Optimum der Flockung zu erzielen (Meinicke), doch wird der Reaktionsablauf bis zu 10 Proz. Kochsalzgehalt nicht wesentlich beeinträchtigt.

Der Meinicke-Extrakt wird durch 2-proz. Kochsalzlösung auch nach mehrtägigem Aufeinanderwirken nicht geflockt; daher kann auch eine „Schutzwirkung" des Normalserums gegen die Ausflockung des Extraktes auf diese Weise nicht nachgewiesen werden.

Verschiedene äquivalente Salzlösungen haben auf den Meinicke-Extrakt verschieden flockenden Einfluß. Dem Kochsalz am nächsten scheint in dieser Beziehung das Ammoniumsulfat zu stehen. Die Stärke des flockenden Einflusses geht nicht parallel mit der Wertigkeit der Metallionen.

Literatur.

1) E. Meinicke, Berl. klin. Wochenschr., 1917, No. 25 und 50; 1918, No. 4.
2) — Münch. med. Wochenschr., 1918, No. 49; Deutsche med. Wochenschr., 1919, No. 7; Münch. med. Wochenschr., 1919, No. 33; Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 28.
3) Lesser, Deutsche med. Wochenschr., 1918, No. 42.
4) Meyeringh, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 30.
5) Epstein und Paul, Med. Klinik, 1920, No. 19.
6) Huebschmann, Münch. med. Wochenschr., 1920, No. 9.
Schmidt und Pott, Deutsche med. Wochenschr., 1920, No. 19.
Blasius, Deutsche med. Wochenschr., 1920, No. 31.
Pesch, Münch. med. Wochenschr., 1920, No. 43.
Konitzer, Deutsche med. Wochenschr., 1920, No. 4.
Weisbach, Deutsche med. Wochenschr., 1921, No. 22.
7) Hauptmann und Hössli, Münch med. Wochenschr., 1910, No. 30.
8) R. Bauer, Lues und innere Medizin, 1910, Deuticke.
9) R. Müller, Serologie der Lues.
10) Mandelbaum, Münch. med. Wochenschr., 1918, No. 11.
11) Berczeller, Wiener klin. Wochenschr., 1918, No. 17,
12) Lange, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 26.
13) Porges und Meier, Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 15.
14) Meinicke, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 27, 28, 29.
15) K. Scheer, Münch. med. Wochenschr., 1921, No. 2.
16) Niederhoff, Münch. med. Wochenschr., 1921, No. 11.
17) Epstein und Paul, Arch. f. Hyg., Bd. 90; Wiener Biolog. Ges., 12. IV. 1921; Münch. med. Wochenschr., 1921, No. 16.
18) Joel, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 29.
19) Landsteiner und Pauli, 25. Kongreß f. inn. Med., 1908.
20) Pauli, Matula und Sameč, zit. aus Pauli, Kolloidchemie der Eiweißkörper, 1920.
21) Pauli, l. c.
22) Sachs und Altmann, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 26.
23) Neukirch, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 29.
24) Konitzer, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 30.
25) Sachs und Georgi, Med. Klinik, 1918, No. 33.

[Aus der bakteriologischen Abteilung des Reichsgesundheitsamts
(Dir.: Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. L. Haendel).]

Untersuchungen über unspezifische Reaktionen bei präzipitierenden Antiseren.

Von **P. Manteufel** und **H. Beger.**

Mit 1 Abbildung im Text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 15. August 1921.)

Wie bei allen anderen biologischen Reaktionen haben sich mit zunehmender Erfahrung auch bei der Eiweißdifferenzierung durch präzipitierende Antisera gewisse Einschränkungen des Spezifitätsgesetzes ergeben, die man bei der praktischen Ausführung des Verfahrens berücksichtigen muß. Unspezifische Reaktionen können ihre Ursache im Antiserum, im Antigen und in der Technik haben und sind in den einschlägigen Veröffentlichungen Uhlenhuths und seiner Mitarbeiter (1) sowie anderer Autoren wiederholt besprochen worden. Wir wollen in dieser Mitteilung hauptsächlich auf die im Antiserum liegenden Fehlerquellen zurückkommen, da allem Anschein nach durch einige Arbeiten der neueren Zeit in den Kreisen der Praktiker, die mit der Eiweißdifferenzierung zu tun haben, Zweifel an der Zuverlässigkeit der Antisera als diagnostischer Reagentien für Untersuchungen von so erheblicher wirtschaftlicher Bedeutung, wie sie das Verfahren im Laufe der Zeit erlangt hat, wachgerufen worden sind. Wir entnehmen z. B. dem deutschen Referat einer holländischen Veröffentlichung von Reeser (2) in der Berliner tierärztlichen Wochenschrift folgende Sätze: „Er fand, daß das Antiserum für Mencheneiweiß, gewonnen aus Kaninchen, neben den spezifischen Präzipitinen auch oft heterologe Präzipitine enthielt gegen die verschiedenen Tiereiweißarten. Es kommt sogar vor, daß das Antiserum stärker auf das

nicht spezifische Eiweiß wirkt als auf das spezifische. Für die gerichtliche Medizin ist dies von großer Bedeutung. Wie oft mag Menschenblut durch die Eiweißreaktion festgestellt sein, wenn eine andere Blutart vorlag! Nur durch gründliche Untersuchung unter Vergleich von möglichst zahlreichen tierischen Eiweißarten kann eine spezifische Reaktion dargetan werden, aber vollkommene Sicherheit hat man auch dann nicht. Beim Nachweis von Fleisch- und Wurstverfälschungen liegen die Verhältnisse ähnlich; auch hier ergeben sich leicht Mißdeutungen wegen der starken Verwandtschaftsreaktionen und des Auftretens von heterologen Präzipitinen. Beim Nachweis solcher Verfälschungen ist die Ambozeptorbindungsreaktion von größerer Bedeutung. Es ist hohe Zeit, daß von maßgebender Stelle alle gerichtlichen Blutuntersuchungen und die fraglichen Prüfungen bei Fleisch- und Wurstverfälschungen an ein Zentralinstitut übertragen werden."

In einem Uebersichtsreferat über den jetzigen Stand der Eiweißdifferenzierung mit Hilfe biologischer Methoden sagt Titze (3) bezüglich des Präzipitationsverfahrens unter anderem: „Hinsichtlich der zu verwendenden Antieiweiß-Seren ist die größte Vorsicht geboten. Ganz abgesehen davon, daß die Präzipitinreaktion nur eine Gattungsreaktion ist, so daß sich z. B. die Eiweißarten der verschiedenen Wiederkäuer nicht differenzieren lassen, ist in den letzten Jahren im Anschluß an die Entdeckung von Forssman (4) bisweilen noch ein weiteres Uebergreifen der Präzipitinreaktion beobachtet worden .... Ferner: Auf Grund vorstehend erwähnter Untersuchungen [gemeint ist hauptsächlich die später zu besprechende Arbeit von Friedberger und Collier (5)] scheint es geboten zu sein, bei den Schlußfolgerungen aus dem Präzipitationsverfahren noch vorsichtiger zu verfahren als bisher. Die Antisera müssen von unbedingt zuverlässiger Seite stammen und unter Berücksichtigung einer erhöhten Mitpräzipitation ausgewertet sein. Beim Nachweis von Pferdefleisch ist außer einer Rinderserumkontrolle noch eine Schafserumkontrolle anzusetzen."

Beim Lesen dieser Zeilen wird manchem Unbefangenen der Verdacht aufsteigen, daß die Eiweißdifferenzierung durch

die Präzipitinreaktion in ihren Grundlagen erschüttert ist, und daß man auch bei sachkundigster Handhabung des von Uhlenhuth und seinen Mitarbeitern (1) ausgearbeiteten Verfahrens Täuschungen ausgesetzt ist, die durch bisher nicht beachtete unspezifische Reaktionen der Antisera begründet sind.

In den einschlägigen Abhandlungen war bisher nur auf die Verwandtschaftsreaktionen und die heterologen Trübungen der präzipitierenden Antisera als Fehlerquellen aufmerksam gemacht worden. Nach Untersuchungen von Friedberger und Collier (5), sowie Friedberger und Jarre (6) hat man außerdem angeblich in großem Umfange mit Fehlerquellen durch Entstehung sogenannter „heterogenetischer" Präzipitine im Antiserum zu rechnen. Friedberger schränkt zwar in der Arbeit mit Jarre die Bedeutung dieser heterogenetischen Reaktionen sehr ein, indem zugegeben wird, daß das Verfahren von Uhlenhuth in der Praxis spezifisch ist, wenn man derartige Antisera ganz ausschaltet. Neumark (7), der die Ergebnisse nachgeprüft hat, ist sogar der Ansicht, daß es sich hier überhaupt nicht um besondere „heterogenetische" Präzipitine, sondern lediglich um die bekannten Erscheinungen der Mitpräzipitation handelt, aber es schien doch unbedingt notwendig, die Frage der unspezifischen Antiserumreaktionen unter diesen neuen Gesichtspunkten an einem größeren Material zu überprüfen.

Die notwendigen Begriffsbestimmungen mögen zuvor kurz ins Gedächtnis zurückgerufen sein: „Verwandtschaftsreaktionen" nennt man die Präzipitate, die ein spezifisches Antiserum in den Lösungen der dem Antigen verwandtschaftlich nahestehenden Eiweißarten hervorruft; sie treten meist auch in den Antigenverdünnungen stärkeren Grades auf. „Heterologe" Trübungen nennt Uhlenhuth die Fällungen, die auch in den Lösungen nicht verwandter Eiweißarten auftreten; sie sind meist nur in den Antigenverdünnungen geringeren Grades zu beobachten und für den Geübten auch sonst von spezifischen Präzipitaten zu unterscheiden. Nuttall (8) nimmt an, daß sie der Ausdruck einer weiter umgrenzten Verwandtschaft sind, wie man sie z. B. für alle Säugetiere oder für alle Vögel untereinander voraussetzen muß (mammalian reaction). Unter „heterogenetischen" Präzipitinen verstehen Friedberger und seine Mitarbeiter solche, die auf die Antigene nicht verwandter Eiweißarten übergreifen und dabei denselben Gesetzen folgen, die Forssman u. a. (4) bei den heterogenetischen Hämolysinen ermittelt haben. Dieser Autor fand, daß Kaninchen, die man mit Organeiweiß von Meerschweinchen (am besten eignete sich Niere) im-

munisiert, Hämolysine für Hammel- und Ziegenblutkörperchen bilden. Beim weiteren Studium dieser auffallenden Erscheinung ergab sich, daß auch die Organe von Pferd, Hund, Katze, Huhn und einigen anderen Tieren bei parenteraler Einverleibung im Kaninchenorganismus die gleichen Hämolysine entstehen lassen.

In gleicher Weise sollen nun außer den heterogenetischen Hämolysinen heterogenetische Präzipitine zustande kommen, und zwar oft in so beträchtlicher Stärke, daß sie den Titer für das homologe Antigen erreichen und übertreffen. Danach müßte man z. B. bei einem präzipitierenden Antiserum für Pferdeeiweiß mit einer gewissen Regelmäßigkeit eine mehr oder weniger starke Fällungsreaktion in Lösungen von Hammel- und Ziegeneiweiß erwarten. Es ist klar, daß derartige Antisera für die praktische Diagnostik unbrauchbar wären, und wenn es sich hier in der Tat um gesetzmäßige Vorgänge handelte, wären eigentlich für diagnostische Zwecke nur die selteneren Antisera verwendbar, die eine Ausnahme von den heterogenetischen Gesetzen bilden. Für die Herstellung präzipitierender Antisera zu praktischen Zwecken würden sich daraus insofern Schwierigkeiten ergeben, als der größere Teil der Antisera infolge des Gehalts an heterogenetischen Präzipitinen ausgeschaltet werden müßte.

Somit war der Plan unserer Untersuchungen der, die Häufigkeit unspezifischer Reaktionen bei möglichst zahlreichen für die Praxis hergestellten Antiseren zu ermitteln und den Bedingungen ihrer Entstehung und Vermeidung nachzugehen.

Zunächst wurden die in der Abteilung zur Abgabe an andere Dienststellen hergestellten und vorrätig gehaltenen Antisera von den gegebenen Gesichtspunkten aus einer Nachprüfung unterzogen. Als Antigene wurden sowohl für die Herstellung als für die Auswertung der Antisera im allgemeinen Blutsera und nicht Organextrakte verwandt, wie es von Uhlenhuth vorgeschrieben ist. Diese Blutsera wurden zum Teil aus dem Berliner städtischen Schlachthof bezogen, zum Teil von Tieren, die im Reichsgesundheitsamt gehalten werden, gewonnen, indem wir Blut der betreffenden Tiere möglichst steril auffangen ließen. Das vom Blutkuchen abgegossene Serum wurde scharf zentrifugiert, bis es vollkommen klar war, und in zugeschmolzenen Reagenzgläschen

ohne Zusatz von Karbolsäure oder Chloroform verwahrt. Das Menschenserum verschafften wir uns aus dem hiesigen Stubenrauch-Kreiskrankenhaus[1]), indem wir die bei der Wassermannuntersuchung übrig gebliebenen „negativen“ Sera sammelten und klar zentrifugierten.

Die zwecks Prüfung der Antisera angebrochenen Antigenröhrchen wurden im Beginn unserer Untersuchungen mit einigen Kubikzentimetern Chloroform versetzt, um nachträgliche bakterielle Infektionen zu vermeiden. Diese Konservierung der Prüfungsantigene hat sich aber nicht bewährt, da sich nach dem Zusatz von Chloroform die Sera meist trüben und an der Berührungsstelle einen Niederschlag von ausgefällten Eiweißkörpern bilden. Durch Vergleichsprüfungen frisch gewonnener Antigene mit solchen, die längere Zeit (6—8 Wochen) über Chloroform aufbewahrt worden waren, konnten wir uns häufig davon überzeugen, daß die Antigene durch den Zusatz von Chloroform in ihrer Reaktionsfähigkeit beeinträchtigt werden. Beispielsweise können Antisera, die mit frischem Antigen einen Titer von 20000 zeigen, mit einem längere Zeit über Chloroform aufbewahrten Antigen nur eine schwache Trübung in der Verdünnung 1 : 1000 aufweisen.

Wir haben deshalb von dem Zusatz antibakterieller Mittel zum Prüfungsantigen später vollkommen Abstand genommen. Statt solcher Konservierungsflüssigkeiten haben wir die Antigene durch Ueberschichten mit dem (sofern es gereinigt ist) indifferenten flüssigen Paraffin steril zu halten versucht. Die Entnahme von Serum aus einem solchen überschichteten Reagenzglas geschieht mittels Kapillarpipette. Diese Methode hat sich bisher durchaus bewährt. Antigene, die seit 6 Monaten unter Paraffinöl aufbewahrt wurden, haben sich, ungeachtet laufender Benützung, vollkommen klar und unverändert erhalten und die gleiche Wirksamkeit wie frisch entnommene Antigensera gezeigt.

Auf die einwandfreie Beschaffenheit der Prüfungsantigene ist bei der quantitativen Auswertung der präzipitierenden Anti-

---

1) Herrn Prosektor Dr. Walkhoff sprechen wir auch an dieser Stelle für die Ueberlassung der Menschensera unseren verbindlichsten Dank aus.

sera besonderes Gewicht zu legen. Denn nach unseren Erfahrungen können einwandfreie Antisera mit zersetzten oder längere Zeit über Chloroform aufbewahrten Antigenen unter Umständen schwache spezifische Reaktionen geben, die leicht zu übersehen sind, und andererseits werden nicht so selten durch solche Antigene „heterologe Trübungen“ vorgetäuscht, die bei Benutzung frischer Antigene nicht in Erscheinung treten. Bei der praktischen Ausführung der Eiweißdifferenzierung ist man zwar gegen derartige Irrtümer durch die mannigfachen vorgeschriebenen Kontrollen geschützt, indes ist auch hier die Verwendung von frischen Kontrollantigenen vorzuziehen.

Bezüglich der Titerprüfung haben wir uns an die bekannten Uhlenhuthschen Vorschriften (1) gehalten. Die Auswertung erfolgte für das homologe Antigen in den Verdünnungen 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10000 und 1 : 20000; die heterologen Antigene wurden in den Verdünnungen 1 : 100, 1 : 200 und 1 : 1000 geprüft, wobei immer 0,9 ccm Antigenverdünnung mit 0,1 cm Antiserum unterschichtet wurden. Der Ablauf der Reaktion wurde ohne zu schütteln im durchfallenden Lichte vor einem schwarzen Pappschirm betrachtet, und der Befund sofort nach Zusatz des Antiserums, sowie nach 3, 5, 10 und 20 Minuten notiert. Als Titer des geprüften Antiserums wurde in allen Fällen der Befund nach 10 Minuten eingetragen. Von jedem neu hergestellten und bereits vorrätigen Antiserum wurde in dieser Weise eine Prüfungstabelle angelegt.

Für die Untersuchungen standen uns im ganzen 67 zur Abgabe bereit gehaltene oder im Laufe der Untersuchungen hergestellte Antisera zur Verfügung, und zwar 10 Menschen-, 16 Pferde-, 15 Schweine-, 11 Hammel-, 6 Ziegen- und 9 Rinderantisera.

Ueber die Untersuchungsergebnisse unserer Menschenantisera gibt die Tabelle I Aufschluß.

Außer Menschenantiserum No. 546, das eine geringe Reaktion mit Hammel- und Ziegenantigen in der Verdünnung 1 : 100 gab, fanden wir ein Uebergreifen auf heterologes Eiweiß nur noch bei Antiserum No. 451, welches mit Hammel, Ziege, Schwein bis zu der Verdünnung 1 : 200, mit Rind bis 1 : 1000 eine geringe Trübung hervorrief.

Tabelle I.
Menschenantisera.

Lfd. No.	Nummer des Antiserums	Titer des Antiserums 1:1000	1:10000	1:20000	Uebergreifen des Antiserums auf
1	451	+[1])	+	+	Hammel 200 ±; Ziege 200 ±; Rind 1000 ±; Schwein 200 ±
2	452	+	+	±	
3	457	+	+	±	
4	458	+	+	+	
5	459	+	+	+	
6	481	+	+	+	
7	483	+	+	+	
8	544	+	+	±	
9	546	+	+	+	Hammel 100 ±; Ziege 100 ±
10	583	+	+	±	

Unter den von uns untersuchten Pferdeantiseren, deren Präzipitinwirkung aus Tabelle II ersichtlich ist, zeigten

Tabelle II.
Pferdeantisera.

Lfd. No.	Nummer des Antiserums	Titer des Antiserums 1:1000	1:10000	1:20000	Uebergreifen des Antiserums auf
1	393	+	+	+	Schwein 100 ±
2	416	+	+	±	
3	420	+	+	+	
4	469	+	+	±	Schwein 100 ±
5	470	+	+	+	
6	474	+	±	±	Mensch 200 +; Schwein 200 +; Hammel 200 ±; Ziege 1000 ±; Rind 200 ±
7	497	+	+	±	
8	498	+	+	+	
9	499	+	+	+	
10	501	+	+	±	
11	502	+	±	—	Schwein 200 ±; Hammel 100 ±; Ziege 100 ±; Rind 100 ±
12	505	+	+	±	
13	506	+	+	+	Ziege 200 ±
14	507	+	+	±	
15	535	+	+	+	
16	536	+	+	±	

1) + : starkes Präzipitat innerhalb 10 Minuten; ± : schwaches Präzipitat innerhalb 10 Minuten; — : kein Präzipitat innerhalb 10 Minuten.

4 Antisera mit heterologen Antigenen bis 1 : 200 Trübungen, und zwar reagierten Antiserum No. 393 und 469 mit Schweineantigen ganz gering in der Verdünnung 1 : 100, Antiserum No. 506 mit Ziegenantigen bis zur Verdünnung 1 : 200, während Antiserum No. 502, dessen homologer Titer nur bis 10000 ging, mit Hammel, Ziege, Rind 1 : 100, mit Schwein bis 1 : 200 eine ±-Reaktion anzeigte. Nur Antiserum No. 474 griff auf Ziegenantigen bis zur Verdünnung 1 : 1000 in Form einer geringen Trübung über. Dasselbe Antiserum ergab mit Menschen- und Schweineantigen bis zur Verdünnung 1 : 200 eine deutliche Präzipitation (+-Reaktion), während es in Hammel- und Rinderantigenverdünnungen der gleichen Konzentration nur ganz schwache Reaktionen hervorrief.

Das Verhalten der Schweineantisera ergibt sich aus Tabelle III.

Tabelle III.

Schweineantisera.

Lfd. No.	Nummer des Antiserums	Titer des Antiserums			Uebergreifen des Antiserums auf
		1:1000	1:10000	1:20000	
1	405	+	—	—	
2	465	+	+	+	Mensch 100 ±; Ziege 100 ±
3	467	+	±	—	
4	485	+	+	+	
5	486	+	+	±	
6	488	+	+	+	Mensch 100 ±
7	489	+	+	+	Mensch 200 ±; Hammel 1000 ±; Ziege 1000 ±; Rind 1000 ±
8	515	+	+	+	Mensch 1000 ±; Hammel 1000 ±; Ziege 1000 ±; Rind 1000 ±
9	528	+	+	±	
10	529	+	+	+	
11	530	+	+	+	Mensch 100 ±; Hammel 200 ±; Ziege 200 ±; Rind 200 ±; Pferd 100 ±
12	532	+	+	+	
13	558	+	+	+	
14	574	+	+	±	
15	575	+	+	±	

Von den untersuchten Antiseren zeigten 2, Antiserum No. 489 und 515, heterologe Trübungen bis zu Verdünnungen von 1 : 1000 ±, und zwar griff Antiserum No. 515 in gleicher Stärke auf Mensch, Hammel, Ziege und Rind über, während

Antiserum No. 489 mit Hammel, Ziege und Rind bis 1:1000 reagierte, mit Mensch nur bis 1:200. Drei weitere Antisera, Antiserum No. 465, 488 und 530, ergaben geringe heterologe Trübungen in den stärkeren Konzentrationen: Antiserum No. 465 mit Menschen- und Ziegenantigen 1:100, Antiserum No. 488 mit Menschenantigen 1:100 und Antiserum No. 530 mit Menschen- und Pferdeantigen 1:100, mit Hammel-, Ziegen- und Rinderantigen bis 1:200.

Der Präzipitingehalt der von uns untersuchten Hammelantisera ist aus Tabelle IV ersichtlich.

Tabelle IV.
Hammelantisera.

Lfd. No.	Nummer des Antiserums	Titer des Antiserums			Uebergreifen des Antiserums auf
		1:1000	1:10000	1:20000	
1	400	+	±	±	Ziege 1000 +
2	434	+	+	+	Ziege 20000 +; Rind 20000 ±; Mensch 200 ±; Schwein 1000 ±
3	490	+	+	±	Ziege 20000 +; Rind 20000 ±; Mensch 100 ±
4	491	+	+	+	Ziege 20000 +; Rind 20000 ±; Mensch 200 ±; Schwein 200 ±; Pferd 200 ±
5	492	+	+	±	Ziege 20000 +; Rind 20000 +; Pferd 1000 ±
6	493	+	+	+	Ziege 20000 +; Rind 1000 +
7	494	+	+	+	Ziege 20000 +; Rind 20000 +; Mensch 100 ±
8	553	+	+	+	Ziege 20000 ±; Rind 10000 ±
9	554	+	+	+	Ziege 20000 ±; Rind 100 ±
10	555	+	+	+	Ziege 20000 +; Rind 10000 ±
11	556	+	+	±	Ziege 10000 ±; Rind 1000 ±

Alle Antisera zeigten die Verwandtschaftsreaktion mit Ziegen- und Rinderantigen. Die Mitpräzipitation in Ziegenantigen erfolgte meist bis zur Stärke des homologen Antigens. Mit Rinderantigen reagierte ein Antiserum, No. 554, nur ganz gering in der Verdünnung 1:100, zwei Antisera, No. 493 und 556, bis zur Verdünnung 1:1000, während die übrigen 8 Antisera mit dem Rinderantigen fast gleich starke Präzipitate wie mit dem homologen Antigen bzw. dem Ziegenantigen erzeugten. Eine heterologe Trübung bis zur Verdünnung 1:1000 zeigte Antiserum No. 434 mit Schweineantigen, dagegen mit Menschenantigen nur bis 1:200. Ebenso griff Antiserum No. 492 auf Pferdeantigen bis zur Verdünnung 1:1000 über. Von den übrigen Antiseren ergaben Antiserum

No. 490 und 494 mit Menschenantigen 1:100 geringe Trübungen.

Die Resultate der 6 untersuchten Ziegenantisera ergeben sich aus Tabelle V.

Tabelle V.
Ziegenantisera.

Lfde. No.	Nummer des Antiserums	Titer des Antiserums 1:1000	1:10000	1:20000	Uebergreifen des Antiserums auf
1	415	+	+	+	Hammel 20000 +; Rind 20000 ±; Schwein 1000 +
2	425	+	—	—	Hammel 1000 +; Rind 1000 +
3	427	+	—	—	Hammel 100 +; Rind 100 +
4	508	+	+	±	Hammel 10000 ±; Rind 1000 ±
5	511	+	+	±	Hammel 10000 ±; Rind 1000 +
6	579	+	+	±	Hammel 10000 ±; Rind 1000 ±

Die Verwandtschaftsreaktion mit Hammel- und Rinderantigen trat bei allen Antiseren in Erscheinung, wenn auch die Titergrenze für beide meist geringer war. Ein Uebergreifen auf nicht verwandte Antigene zeigte nur Antiserum No. 415. Dieses ergab mit Schweineantigen bis zur Verdünnung 1:1000 ein deutliches Präzipitat (+-Reaktion), das bei einer Verdünnung von 1:2000 nicht mehr auftrat.

Ueber das Verhalten der von uns untersuchten 9 Rinderantisera gibt die Tabelle VI Aufschluß.

Tabelle VI.
Rinderantisera.

Lfde. No.	Nummer des Antiserums	Titer des Antiserums 1:1000	1:10000	1:20000	Uebergreifen des Antiserums auf
1	429	+	+	+	Ziege 20000 +; Hammel 20000 +; Mensch 1000 ±; Schwein 1000 ±
2	443	+	+	+	Ziege 20000 +; Hammel 20000 +; Mensch 200 ±
3	444	+	±	±	Ziege 20000 ±; Hammel 20000 +; Schwein 200 ±
4	445	+	+	+	Ziege 20000 +; Hammel 20000 +
5	464	+	+	+	Ziege 20000 ±; Hammel 20000 ±; Pferd 100 ±
6	476	+	+	+	Ziege 20000 ±; Hammel 20000 ±; Schwein 1000 ±
7	479	+	+	+	Ziege 20000 ±; Hammel 20000 ±; Schwein 200 ±
8	524	+	+	+	Ziege 1000 +; Hammel 10000 ±; Mensch 100 ±; Schwein 200 ±; Pferd 200 ±
9	577	+	+	±	Ziege 1000 ±

Die Verwandtschaftsreaktion mit Hammel- und Ziegenantigen war bei allen Antiseren in der gleichen Stärke wie mit dem homologen Antigen vorhanden. Nur ein Antiserum, No. 577, machte eine Ausnahme davon, indem es nur mit Ziegenantigen in der Verdünnung 1:1000 eine geringe Trübung ergab (±-Reaktion), während eine Präzipitation mit Hammelantigen überhaupt nicht erfolgte. Zwei Antisera zeigten eine heterologe Trübung in Antigenverdünnungen 1:1000, und zwar griff über: Antiserum No. 429 auf Mensch und Schwein, Antiserum No. 476 auf Schwein allein. Fünf weitere Antisera reagierten mit Antigenverdünnungen bis 1:200: Antiserum No. 443 ergab eine geringe Trübung mit Mensch 1:200, Antiserum No. 444 und 479 mit Schwein 1:200 und Antiserum No. 464 mit Pferd 1:100, dagegen rief Antiserum No. 524 in Menschenantigen 1:100, sowie in Schweine- und Pferdeantigen 1:200 ±-Reaktionen hervor.

Fassen wir unsere Prüfungsergebnisse zusammen, so waren von den untersuchten 67 Antiseren 42 = 63 Proz. absolut spezifisch, d. h. sie reagierten nur mit dem homologen Antigen und gaben selbst in den starken Konzentrationen 1:100 und 1:200 der heterologen Antigene keine Spur von Trübung. Die Verwandtschaftsreaktionen bei den Hammel-, Ziegen- und Rinderantiseren sind hierbei natürlich nicht als unspezifische heterologe Reaktionen gerechnet.

Weitere 16 Antisera = 24 Proz. gaben mit einzelnen heterologen Antigenverdünnungen 1:100 und 1:200 ganz geringe Reaktionen (±-Reaktionen). Da die Präzipitinreaktion in der Praxis nach Uhlenhuths Vorschrift mit einer Antigenverdünnung von 1:1000 angestellt wird (der Serumantigenverdünnung 1:1000 entspricht in der Praxis eine Fleischantigenverdünnung 1:300), und diese 16 Antisera bei Zusatz zu den heterologen Antigenverdünnungen 1:1000 keine Präzipitation hervorzurufen imstande waren, so dürfen auch diese 16 Antisera als für die praktische Verwendung geeignet bezeichnet werden. Von den 67 Antiseren konnten also 58 = 87 Proz. als brauchbar abgegeben werden.

Nur 9 Antisera = 13 Proz. zeigten auch in vereinzelten heterologen Antigenverdünnungen 1:1000 ganz geringe Trübungen (±-Reaktionen). Ein einziges Antiserum (Ziegenantiserum No. 415) ergab noch mit einer Schweineantigenverdünnung 1:1000 ein deutliches Präzipitat, welches jedoch bei einer Verdünnung des Schweineantigens auf 1:2000 nicht mehr auftrat. Auch mit diesen 9 Antiseren ist zwar eine diagnostische Fehlreaktion praktisch ausgeschlossen, denn die Präzipitatbildung in der homologen Antigenverdünnung 1:1000, 1:10000 und 1:20000 tritt so viel rascher und deutlicher in Erscheinung, daß die schwächeren heterologen Trübungen keinerlei Anlaß zum Zweifel bieten. Trotzdem werden sie nach der Vorschrift nicht an andere Dienststellen abgegeben.

Die Verteilung der absolut spezifischen, der noch einwandfreien sowie der nicht einwandfreien Antisera auf die verschiedenen Antisera-Arten zeigt die folgende Zusammenstellung (Tabelle VII).

Tabelle VII.

Antiserumart	Anzahl der untersuchten Antisera	Davon zeigten		
		absolut spezifische Reaktion	Trübungen in heterologen Antigenverdünnungen	
			1:100 u. 1:200	1:1000
1. Menschenantisera	10	8	1	1
2. Pferdeantisera	16	11	4	1
3. Schweineantisera	15	10	3	2
4. Hammelantisera	11	6	3	2
5. Ziegenantisera	6	5	0	1
6. Rinderantisera	9	2	5	2
Summa	67	42	16	9
in Prozenten		63 Proz.	24 Proz.	13 Proz.

Wie aus Tabelle VII hervorgeht, finden sich bei allen 6 untersuchten Antisera-Arten in gleicher Weise vereinzelte Antisera, die Trübungen mit heterologen Eiweißarten aufwiesen. Eine auffällige Häufung (etwa bei Pferdeantiseren) oder ein völliges Fehlen von heterologen Trübungen

bei einer Antiserumart (etwa beim Menschenantiserum) läßt sich bei unserem Material nicht feststellen.

Diese Ergebnisse stehen zu den Angaben von Friedberger und Collier (5) in einem offenbaren Mißverhältnis. Die Autoren prüften 7 Pferdeantisera auf ihren Gehalt an Hammelpräzipitinen und fanden, daß 5 davon ein ausgesprochenes Uebergreifen auf Hammeleiweiß zeigten; und zwar gaben alle mit Hammeleiweiß positiv reagierenden Pferdeantisera mit dem heterologen Antigen (Hammel) eine mindestens gleich starke Präzipitation, wie mit dem homologen Antigen (Pferd). Ein Pferdeantiserum, dessen homologer Titer im Laufe der Zeit auf 1 : 1000 gesunken war, reagierte sogar zur Zeit der Prüfung mit Hammeleiweiß bis zum ursprünglichen Titer für das homologe Pferdeantigen, d. h. bis 1 : 20000. Nur 2 von den untersuchten 7 Pferdeantiseren riefen keine Präzipitation mit Hammeleiweiß hervor und zeigten streng spezifische Reaktion. Ebenso reagierte ein Katzenantiserum, dessen homologer Titer 1:1000 betrug, mit Hammeleiweiß bei sofortiger Ablesung genau so hoch, nach $^1/_4$ Stunde sogar bis zu einem Titer von 1:20000, während gegenüber dem homologen Eiweiß keine weitere Zunahme stattgefunden hatte. Auch zwei Hühner- und ein Hundeantiserum wurden von Friedberger und Collier untersucht, in der Voraussetzung, daß nach der von Friedberger und Goretti (9) aufgestellten Tabelle auch Hühner- und Hundeorgane Antigene für heterogenetische Hammelantikörper darstellen. Diese Antisera zeigten jedoch mit Hammeleiweiß keine Reaktion. Die Autoren lassen es unentschieden, ob es sich bei diesen 3 Seren um eine grundsätzliche Abweichung vom heterogenetischen Gesetz oder um Zufall handelt.

Neumark (7), der 10 Pferdeantisera auf heterogenetische Präzipitine untersuchte, fand „bei 8 Antiseren kein Präzipitin für Hammeleiweiß; auch bei einer Verdünnung des Hammelantigens 1:100 trat keine Spur von Präzipitation ein. Nur bei 2 Pferdeantiseren zeigte sich eine Präzipitation mit Hammelserum bis zu einer Verdünnung 1:1000, die aber wesentlich schwächer war und erheblich langsamer auftrat als die mit homologem Eiweiß“. Neumark lehnt es ab, „diese Re-

aktionen als die Wirkung von heterogenetischen Präzipitinen anzusehen, da sie den Rahmen der Mitpräzipitation, wie sie auch sonst gelegentlich bei Antiseren gegenüber heterologem Eiweiß beobachtet wird, nicht überschritten".

Wie aus der Tabelle II hervorgeht, fand sich unter den von uns untersuchten 16 Pferdeantiseren ein Uebergreifen auf Hammelantigen nur bei zweien, und zwar rief Antiserum No. 474 mit Hammeleiweiß bis zu der Verdünnung 1:200 und Antiserum No. 502 nur in der Verdünnung 1:100 eine Trübung hervor. Die übrigen 14 Pferdeantisera zeigten auch in dieser starken Konzentration des Hammelantigens keine Reaktion. Bei unseren präzipitierenden Pferdeantiseren konnten wir also die von Friedberger und seinen Mitarbeitern gefundenen heterogenetischen Hammelpräzipitine nicht nachweisen.

Eine Nachprüfung der Untersuchungsergebnisse mit Katzen-, Hunde- und Hühnerantiseren konnte leider nicht vorgenommen werden, da uns keine derartigen Antisera zur Verfügung standen.

Bekanntlich gelingt die Erzeugung von heterogenetischen Hämolysinen in der Regel nur bei Einspritzung von Organeiweiß der in Frage kommenden Tierarten, nicht aber bei Immunisierung mit Blutserum. Da auch die von Friedberger und seinen Mitarbeitern hergestellten präzipitierenden Antisera durch Immunisierung mit Serum- und nicht mit Organeiweiß gewonnen sind, ist es nicht verständlich, daß sich gerade unter diesen Bedingungen so starke heterogenetische Präzipitine gebildet haben. Nimmt man beispielsweise an, daß bei der Vorbehandlung von Kaninchen mit Pferdeserum, also mit Serumeiweiß einer Tierart, deren innere Organe (Niere) nachweislich heterogenetische Hämolysine bilden, auch heterogenetische Präzipitine entstehen, so müßte man das Gleiche der Erfahrung nach noch ausgesprochener bei Vorbehandlung von Kaninchen mit Organeiweiß eines Pferdes, also z. B. mit wässerigen Pferdenierenauszügen erwarten.

Zwecks Untersuchung dieser Frage wurden zunächst zwei Kaninchen (No. 539 und 540) mit wässerigem Pferdenierenextrakt immunisiert. Zur Herstellung des Pferdenierenextraktes wurde eine Pferdeniere durch eine Fleischmaschine

gepreßt und das Organmus im Faust-Heimschen Trockenapparat getrocknet. Die Trockensubstanz wurde dann im Mörser pulverisiert und je 1 g mit 1 ccm destilliertem Wasser 2—3 Stunden unter häufigem Umschütteln extrahiert. Nach dem Zentrifugieren dieses Auszuges erhält man eine rötlichbraune, klare Flüssigkeit, die mit der gleichen Menge 1,8-proz. NaCl-Lösung versetzt, intravenös eingespritzt werden kann. Den beiden obigen Versuchstieren wurden je 5,0 ccm Pferdenierenextrakt 3mal intraperitoneal in Zwischenräumen von ca. 8 Tagen injiziert. Da die Tiere nach der zweiten Injektion einen schwerkranken Eindruck machten, keine Freßlust zeigten und merklich an Gewicht verloren, so wurde die 3. Injektion erst verabreicht, nachdem die Tiere sich einigermaßen erholt hatten (nach 12 Tagen). 8 Tage nach der letzten Injektion wurde Serum entnommen. Bei der Prüfung der beiden Sera auf heterogenetische Hammelhämolysine ergab sich bei dem einen Tier (No. 540) ein Titer von 1:2000+, bei dem zweiten (No. 539) ein solcher von 1:500+. Die in üblicher Weise angestellte Präzipitinreaktion ergab bei beiden Seren mit Pferdeantigen Präzipitation bis zu einem Titer von 20000, wenn auch bei der letzten Verdünnung nur schwach (±-Reaktion). Mit allen übrigen Antigenen, Menschen-, Schweine-, Hammel-, Ziegen-, Rinder-, Hunde- und Katzeneiweiß, zeigten beide Sera auch in der Verdünnung 1:100 keine Spur von Reaktion.

Daraufhin immunisierten wir 4 weitere Kaninchen mit Pferdenierenextrakt. Diese Tiere erhielten 3 Injektionen von je 2,0 ccm des in gleicher Weise wie oben hergestellten Extraktes intravenös, und zwar die 2. Injektion am 4. Tage, die dritte am 7. Tage. Am 18. Tage nach der 1. Injektion wurde Serum entnommen und geprüft: Die Sera aller vier Versuchstiere wiesen heterogenetische Hammelhämolysine auf, und zwar 2 Tiere (No. 547 und 548) bis zu einem Titer von 1:1000+, die beiden anderen (No. 549 und 550) bis zum Titer 1:500+. Die Präzipitinreaktion ergab bei den beiden Seren mit dem höheren Hämolysintiter mit Pferdeantigen eine deutliche Fällung bis zu einem Titer von 1:20000±, die beiden anderen reagierten nur schwach bis 1:10000. Auch diese vier Sera zeigten mit allen übrigen Eiweißarten, mit denen sie geprüft wurden, selbst in der Antigenverdünnung 1:100 keine

Präzipitation. Zwei weitere Injektionen von 5,0 ccm Extrakt, intraperitoneal verabreicht, vermochten den Titer für die Hammelhämolysine nicht zu verbessern. Dagegen trat nach diesen Injektionen die Präzipitinreaktion mit Pferdeeiweiß deutlicher in Erscheinung, ohne jedoch den Titer 20000 zu überschreiten. Ein Uebergreifen auf heterologe Eiweißarten konnte jedoch auch dann nicht festgestellt werden. Da die Versuchsergebnisse so eindeutig waren, und wir bei allen 6 Seren, obwohl sie heterogenetische Ambozeptoren für Hammelblut enthielten, keine Andeutung von Hammelpräzipitinen nachweisen konnten, sahen wir von weiteren Versuchen nach dieser Richtung ab.

Wir suchten nun weiterhin festzustellen, ob es andererseits gelingt, durch Immunisieren mit dem Blutserum einer Tierart, deren Organeiweiß erfahrungsgemäß heterogenetische Hammelhämolysine bei Kaninchen entstehen läßt, heterogenetische Hammelhämolysine bei Kaninchen hervorzubringen. Die Prüfung unserer sämtlichen präzipitierenden Pferdeantisera ergab, wie aus Tabelle VIII hervorgeht, daß diese 16 Antisera Hammelhämolysine in nennens-

Tabelle VIII.
Untersuchung auf heterogenetische Hämolysine bei präzipitierenden Pferdeantiseren.

Lfde No.	Nummer des Antiserums	Titer des Antiserums (homologes Eiweiß)	Hämolysewirkung von 0,5 ccm Antiserum bzw. Antiserumverdünnung auf 0,5 ccm 5-proz. Hammelblutkörperchenaufschwemmung + 0,5 ccm Meerschweinchenkompl. 1:10									
			Unverd.	1:2	1:5	1:10	1:20	1:50	1:100	1:200	1:500	1:1000
1	393	20 000 +	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	416	20 000 ±	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
3	420	20 000 +	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	469	20 000 ±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	470	20 000 +	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0
6	474	20 000 ±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	497	20 000 ±	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0
8	498	20 000 +	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	499	20 000 +	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	501	20 000 ±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	502	10 000 ±	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
12	505	20 000 ±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	506	20 000 +	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	507	20 000 ±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	535	20 000 +	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	536	20 000 ±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

werter Höhe nicht enthielten. Nur zwei Antisera zeigten eine geringe hämolytische Wirkung bis zu einer Verdünnung 1:10. Diese geringen Reaktionen fallen im Vergleich mit der starken Hämolysinbildung bei den oben besprochenen Pferdenierenextrakt-Seren sicherlich nicht ins Gewicht. Wir sehen in diesen Versuchen mithin keinen Anhaltspunkt dafür, daß man bei der Immunisierung mit Serumeiweiß überhaupt mit der Möglichkeit der Entstehung heterogenetischer Antikörper zu rechnen hat, und das entspricht ganz den Ergebnissen anderer Autoren, die heterogenetische Ambozeptoren nur bei der Immunisierung mit Organeiweiß entstehen sahen.

Ebensowenig können wir uns auch der Ansicht von Friedberger und Jarre (6) anschließen, daß „eigentlich nur das Antimenschenkaninchenserum streng spezifisch reagiert, daß ihm jede Reaktion mit dem Eiweiß der sonst zur Untersuchung herangezogenen üblichen Schlacht- und Haustiere fehlt". An einer anderen Stelle der Arbeit schränken die Autoren anscheinend diese Angaben etwas ein, indem sie schreiben, daß „die am meisten und eingehendsten untersuchten, zugleich wichtigsten forensischen Antisera, nämlich die für Menschenblut, gewonnen beim Kaninchen, sich in der Mehrzahl der Fälle streng spezifisch gegenüber dem Blut unserer gewöhnlichen Schlacht- und Haustiere zeigten". Wie aus der Tabelle I hervorgeht, zeigten zwei unserer Menschenantisera mit heterologen Eiweißarten übergreifende Reaktionen, allerdings nicht mehr, wie sie sich oft auch bei den Säugetier-Antiseren fanden. Nach unseren Erfahrungen können heterologe Trübungen bei allen Antisera-Arten gelegentlich vorkommen, auch beim Menschenantiserum.

Nun sagen Friedberger und Collier (5), daß ihre Pferdeantisera, die heterogenetische Hammelpräzipitine zeigten, auch auf andere Antigene übergegriffen hätten, z. B. auch auf Rind, was bei den heterogenetischen Hämolysinen nicht der Fall ist. Der heterogenetische Charakter dieser Antikörperbildung sei also nicht so sehr aus der Analogie mit den bei der Entstehung heterogenetischer Hämolysine ermittelten Gesetzen zu erschließen, als daraus, daß sich die heterogene-

tischen Präzipitine durch Absättigung mit Hammeleiweiß aus dem Antiserum entfernen und auf diese Weise unspezifische Antisera für die Praxis brauchbar machen ließen.

Wir haben in Anbetracht der praktischen und theoretischen Bedeutung dieses Vorschlages auch derartige Versuche angestellt. Da wir indes keine so hochgradig übergreifenden Antisera in unserer Sammlung hatten, so konnten unsere Versuche nur mit den weniger übergreifenden Antiseren bzw. nur mit Antiseren, die starke Verwandtschaftsreaktionen gaben, ausgeführt werden. Gleichzeitig haben wir bei diesen letzteren Antiseren einen anderen Vorschlag Friedbergers bezüglich der Differenzierung von artverwandtem Eiweiß probiert.

Anschließend an frühere Arbeiten von Rickmann (10), Bauer (11), Sachs und Bauer (12), die durch Verdünnen des Antiserums die in geringen Konzentrationen stets vorhandenen heterologen Trübungen zu beseitigen suchten, stellten Friedberger und Collier (5) fest, daß „schon bei geringgradiger Verdünnung des Antiserums die heterogenetische Quote des Präzipitins gegenüber dem Antigen 1:100 verschwindet, während die isogenetische noch bis zu erheblich weiteren Verdünnungen erhalten bleibt". Unsere diesbezüglichen Versuche haben vorläufig keine praktisch brauchbaren Resultate mit dieser Methode ergeben. Verdünnt man das Antiserum nur gering, 1:2 oder 1:3, so lassen sich keine nennenswerten quantitativen Unterschiede in der Präzipitinwirkung feststellen. Bei stärkerer Verdünnung des Antiserums (auf 1:5 oder 1:10) verliert andererseits auch die homologe Reaktion an Intensität so sehr, daß die Wahrnehmung der Präzipitation bei den Antigenverdünnungen, wie sie die forensische Praxis nach Uhlenhuth und Beumer fordert, nicht mehr möglich ist.

Aus diesem Grunde haben Friedberger und Collier (5) die übergreifenden Antisera durch Absättigen mit einem heterologen Antigen spezifisch zu machen versucht. Zur Absättigung benutzten sie dabei gewaschene Hammelblutkörperchen. Es ergab sich, daß „aus einem Antipferde-Kaninchenserum durch Ausfällung mit Hammelblutkörperchen alle übergreifenden Präzipitine entfernt werden konnten, so daß nur das isogenetische Hauptpräzipitin übrig blieb". Diese Absättigung

gelang nur bei übergreifenden Pferdeantiseren, nicht bei Rinderantiseren und einem streng spezifischen Menschenantiserum; sie erfolgte sowohl mit frischen, wie auch mit auf 100° C erhitzten Hammelblutkörperchen. Friedberger und Jarre (5) haben diese Versuche fortgesetzt und eine ganze Reihe übergreifender Antisera mit nativen bzw. auf 100° C erhitzten Hammelblutkörperchen, sowie mit Kaninchen- und Meerschweinchenblutkörperchen und auch mit verschiedenen Organen dieser Tiere abgesättigt. Es ergab sich dabei, daß es keineswegs immer gelang, mit Hammelblutkörperchen die übergreifenden Präzipitine aus einem Antiserum zu entfernen. Während bei einzelnen Antiseren die Ausfällung der übergreifenden Präzipitine relativ leicht durch Absättigen mit Hammelblutkörperchen erfolgte, war bei anderen Antiseren der verschiedensten Tierarten irgend eine Beeinflussung der heterologen Präzipitine durch Absättigen mit Blutkörperchen von Hammel, Rind, Meerschweinchen, Kaninchen und Mensch, sowie durch Organzellen von Meerschweinchen und Kaninchen nicht zu erzielen. Auch das homologe Präzipitin verhielt sich bei diesen Antiseren gegenüber allen Absättigungsversuchen vollkommen unzugänglich.

Unsere gleichartigen Versuche haben durchweg ein vollkommen negatives Resultat gehabt. Als Absättigungsmittel wurden dabei neben gewaschenen Blutkörperchen von Hammel, Ziege, Rind, Meerschweinchen, Kaninchen und Mensch Organzellen von Meerschweinchen und Kaninchen sowie getrocknete, auf 100° C erhitzte Sera und gewaschenes frisches Fibrin der verschiedenen Tierarten verwendet. Dieses negative Ergebnis der Absättigung unter den oben angegebenen Bedingungen hat uns eigentlich nicht überrascht, denn nach der Erfahrung gelingt auch der Castellanische Versuch mit agglutinierenden Seren im allgemeinen nur, wenn man Serumverdünnungen verwendet. Wir haben uns bei ausgedehnten Untersuchungen über die Differenzierung in der Paratyphusgruppe[1]) mit diesem Verfahren überzeugt, daß sowohl bei Esel- als auch bei Kaninchenseren eine Ab-

---

1) Manteufel und Beger, Weitere Untersuchungen zur Paratyphusfrage. Centralbl. f. Bakt., Bd. 87, Heft 3.

sättigung der Agglutinine bei Verwendung von konzentriertem Serum nicht sicher gelingt. Wenn also die präzipitierenden Antisera sich in unverdünntem Zustand ebenso verhalten wie die agglutinierenden Sera, so sehen wir darin nur eine Bestätigung der Erfahrungstatsache, daß die Versuchsbedingungen in dieser Form nicht günstig gewählt sind. Dagegen ließen die guten Erfolge, die wir beim Castellanischen Versuch mit verdünnten agglutinierenden Seren hatten, erwarten, daß die Absättigung in verdünnten präzipitierenden Antiseren besser gelingen würde.

Zunächst haben wir versucht, aus verdünnten Hammel-, Ziegen- und Rinderantiseren durch Absättigen mit dem homologen Antigen entsprechend der theoretischen Voraussetzung alle Präzipitine zu entfernen. Das gelang wider Erwarten nicht; auch ließ sich dabei keine praktisch brauchbare Verwandtschaftsdifferenzierung erzielen. Weiterhin wurde geprüft, ob es möglich ist, bei den oben genannten Antiseren die Verwandtschaftsreaktionen durch Absättigen mit dem heterologen Antigen zu beseitigen. Auch diese Versuche verliefen negativ. Schließlich haben wir versucht, übergreifende Menschen-, Pferde- und Schweineantisera durch Absättigen von den heterologen Trübungen zu befreien. **Auch hierbei waren die Unterschiede zwischen abgesättigtem und nicht abgesättigtem Antiserum so gering, daß wir uns von diesem Verfahren keine praktische Bedeutung versprechen können** (Tabelle IX und X).

Tabelle IX.
Absättigungsversuche.

Hammelantiserum No. 490 präzipitiert	Hammelantigen			Ziegenantigen			Rinderantigen			NaCl-Kontrolle
	1 : 100	1 : 1000	1 : 10 000	1 : 100	1 : 1000	1 : 10 000	1 : 100	1 : 1000	1 : 10 000	
Verd. 1 : 2 unabgesättigt	+	+	+	+	+	+	+	±	±	—
Verd. 1 : 2 abges. m. gew. Hammelbl.-Körp.	+	+	±	+	+	±	+	±	±	—
Verd. 1 : 4 unabgesättigt	+	+	0	+	+	0	±	±	0	—
Verd. 1 : 4 abges. m. gew. Hammelbl.-Körp.	+	+	0	+	±	0	±	±	0	—
Verd. 1 : 5 unabgesättigt	±	0	0	±	0	0	0	0	0	—
Verd. 1 : 5 abges. m. gew. Hammelbl.-Körp.	±	0	0	±	0	0	0	0	0	—

Tabelle X.

Absättigungsversuche.

Rinderantiserum No. 445 präzipitiert	Rinder-antigen			Hammel-antigen			Ziegen-antigen			NaCl-Kontrolle
	1 : 100	1 : 1000	1 : 10 000	1 : 100	1 : 1000	1 : 10 000	1 : 100	1 : 1000	1 : 10 000	
Verd. 1 : 2 unabgesättigt	+	+	+	+	+	±	+	+	±	—
Verd. 1 : 2 abges. m. gew. Hammelbl.-Körp.	+	+	±	+	+	0	+	+	0	—
Verd. 1 : 4 unabgesättigt	+	+	±	+	±	0	+	±	0	—
Verd. 1 : 4 abges. m. gew. Hammelbl.-Körp.	+	+	±	+	±	0	+	±	0	—
Verd. 1 : 5 unabgesättigt	+	0	0	±	0	0	±	0	0	—
Verd. 1 : 5 abges. m. gew. Hammelbl.-Körp.	+	0	0	±	0	0	±	0	0	—

Auffälligerweise sind auch die erwähnten Absättigungsversuche mit agglutinierenden Seren bei Benutzung von Kaninchenimmunseren unerklärten Schwierigkeiten begegnet im Gegensatz zu Eselimmunseren. Es ist uns auch hier meistens nicht gelungen, Kaninchensera mit dem homologen Antigen restlos abzusättigen. Worauf diese Erscheinung beruht, wagen wir vorläufig nicht zu entscheiden.

Aus der Zusammenfassung unserer Versuchsergebnisse kommen wir zu folgenden Schlußfolgerungen:

1) Die Bildung von heterogenetischen Präzipitinen bei der Immunisierung von Kaninchen mit artfremdem Eiweiß ist nicht denselben Gesetzen unterworfen, die für die heterogenetischen Hämolysine bei der Immunisierung mit artfremdem Organeiweiß bestimmter Tierarten ermittelt worden sind. Wir haben derartige heterogenetische Präzipitine bei der Gewinnung von Pferdeantiseren nach Häufigkeit und Titerhöhe weder in beträchtlichem Umfange gesehen, noch haben wir uns davon überzeugen können, daß bei der Immunisierung mit Blutserum überhaupt heterogenetische Antikörper entstehen. Bei der Immunisierung mit Pferdeserum sahen wir weder heterogenetische Hämolysine noch Präzipitine sich bilden, und sogar unter den Bedingungen der Immunisierung mit Pferdeorganen, die zur Entstehung von heterogenetischen Hämolysinen führte, ließen sich Anhaltspunkte für die Bildung von heterogenetischen Präzipitinen nicht gewinnen. Auch

durch den Absättigungsversuch konnte in unseren Versuchen der heterogenetische Charakter der „heterologen" Trübungen nicht erwiesen werden.

2) Die unspezifischen Trübungen unserer Antisera, die allerdings nur in den Antigenverdünnungen geringen Grades auftraten (heterologe Trübungen nach Uhlenhuth), ließen sich durch Absättigung der Antisera mit gewaschenen Hammelblutkörperchen weder im verdünnten noch im unverdünnten Zustande beseitigen. Ob eine Absättigung konzentrierter Antisera überhaupt möglich ist — denn nur in dieser Form kommt die Antiserumabgabe in Frage — scheint uns nach den Ergebnissen bei der Absättigung agglutinierender Sera unwahrscheinlich, da diese in verdünnter Konzentration ebenfalls in der Regel nicht gelingt. Die Methode scheint uns jedenfalls für die Praxis der Antiserumgewinnung nicht brauchbar zu sein.

3) Die Ausschaltung der Verwandtschaftsreaktionen durch quantitatives Arbeiten mit Antiserumverdünnungen ist uns nicht gelungen.

Wir glauben daher, daß das hochgradige Uebergreifen der von Friedberger und seinen Mitarbeitern beschriebenen Greifswalder Antisera nicht auf heterogenetische Antikörper, sondern auf andere Ursachen zurückzuführen ist. Damit erledigen sich wohl auch alle Zweifel an der Zuverlässigkeit der Eiweißdifferenzierung durch Antisera, die aus diesen Gründen hergeleitet werden. Die Behauptung von Reeser (2), daß man auch bei sachgemäßester Durchführung der Vorschriften seiner Sache nicht ganz sicher sein kann, und daß sogar die Verwechslung von Menschen- und Tierblut infolge Auftretens von heterologen Präzipitinen möglich sei, muß als gänzlich unbegründet zurückgewiesen werden; jedenfalls sind derartige grobe Irrtümer nicht dem Verfahren an sich zur Last zu legen. Es besteht nach den Ergebnissen unserer Nachprüfung auch kein Grund zu einer Unsicherheit bei der Beurteilung der Reaktion, sofern man die Vorsicht walten läßt, die durch die von

Uhlenhuth aufgestellten Vorschriften bereits empfohlen ist. Wenn in dem Referat von Titze weiterhin als Mangel der Präzipitinreaktion der Umstand angeführt wird, daß es sich nur um eine Gattungsreaktion handelt, so trifft das hier nicht mehr und nicht weniger zu als beispielsweise für die Agglutinationsreaktion, die für die Artdifferenzierung der Bakterien eine so erhebliche Bedeutung gewonnen hat. Ebenso wie dort nehmen auch hier die Schwierigkeiten der Differenzierung mit der Verwandtschaftsnähe zweier Arten zu. Die Unterscheidung zwischen Schaf und Rind gelingt indes bei quantitativem Arbeiten öfters, und es gibt Antisera, die so große Titerdifferenzen zeigen, daß man sie praktisch als artspezifisch bezeichnen kann. Zwischen Schaf und Ziege ist die Verwandtschaft ja noch näher, und dementsprechend die Differenzierung mit den bisher üblichen Verfahren in der Regel nicht durchführbar. Wie erwähnt, ist sie uns auch unter Zuhilfenahme des Absättigungsverfahrens nicht gelungen, aber es ist zu erwarten, daß die Zukunft auch hier Fortschritte bringt, insonderheit daß auch willkürlich die Herstellung von Antiseren mit strengerer Artspezifizität gelingen wird, nachdem sich gezeigt hat, daß der Zufall gelegentlich solche artspezifischen Sera entstehen läßt.

Daß bei richtiger Auswahl der Antisera, d. h. bei Ausschaltung der Nummern, die heterologe Trübungen zeigen, für den geübten Untersucher keine Zweifel entstehen, ist auch von Friedberger und Jarre (6) zugestanden. Immerhin fallen bei dieser Auswahl eine gewisse Anzahl Antisera für die praktische Verwertung aus. Bei unserem Material waren es 13 Proz., aber es scheint, daß man auch mit weit größeren Ausfällen rechnen muß, wie das Material des Greifswalder Institutes zeigt. Zusammen mit dem oft ganz beträchtlichen Bruchteil derjenigen Serumkaninchen, die überhaupt keine Präzipitine liefern, würde das bei den gegenwärtigen hohen Kosten der Kaninchen einen so erheblichen Verlust darstellen, daß die Gewinnung präzipitierender Antisera ein recht unwirtschaftliches Unternehmen wäre.

Es ist mithin für die Praxis der Antiserumgewinnung keine unwichtige Aufgabe, die Ursachen für das Auftreten heterologer Trübungen genauer als bisher kennen und be-

seitigen zu lernen. In dieser Hinsicht haben unsere Untersuchungen ergeben, daß die Verarbeitung von frischen Antigenen oder solchen, die durch die Aufbewahrung oder Konservierung noch keinerlei Abbau der artspezifischen Eigenschaften erfahren haben, von größter Wichtigkeit ist, aber in der Praxis meistens unterschätzt wird. Sera, die lange in flüssiger Form aufbewahrt sind, verlieren an antigenen Eigenschaften, auch wenn sie ohne Zusatz von Konservierungsmitteln steril gehalten sind. Antisera, die mit alten oder konservierten Antigenen hergestellt sind, neigen auch mehr zu heterologen Trübungen als solche, die mit frisch gewonnenem Blutserum gemacht werden. Wir sind gegenwärtig damit beschäftigt, eine praktische Methode der sterilen Antigenaufbewahrung zu ermitteln, bei der der Abbau der antigenen spezifischen Stoffe auf ein unvermeidliches Minimum herabgesetzt ist.

Nicht minder wichtig für die Hintanhaltung störender heterologer Trübungen bei der Antiserumgewinnung ist nach unseren Erfahrungen der Umstand, daß die Hochtreibung der Antikörper rasch und ununterbrochen zustande kommt. Präzipitierende Antisera, die nach 3 Injektionen den erforderlichen Titer erreicht haben, zeigen sich gewöhnlich spezifischer als solche, bei denen 8 und 10 Einspritzungen für den Zweck erforderlich waren. Wir haben in dieser Hinsicht z. B. eine 3malige Einspritzung von kleinen Dosen am 1., 4. und 7. Tage zweckmäßiger gefunden als die öftere Injektion von steigenden Mengen in Abständen von 10—14 Tagen. Allerdings steht diesem Vorgehen häufig das Hindernis im Wege, daß viele Antisera in dieser kurzen Zeit nicht die erforderliche Titerhöhe von 1:20000 erreichen. Namentlich in gewissen Jahreszeiten, z. B. im Vorfrühling und Spätherbst, wo die Fütterung der Tiere gewisse Schwierigkeiten bietet und Umstellungen notwendig macht, hat man der Erfahrung nach mit häufigeren Versagern zu rechnen, wie es ja auch eine allgemeine Erscheinung ist, daß bei der knappen Kraftfütterung der Nachkriegszeit die Antikörpergewinnung auf allen Ge-

bieten früher nicht gekannte Schwierigkeiten bereitet. Wir haben diese Tatsache experimentell genauer verfolgt und gefunden, daß Kaninchen, die nebenbei reichlich mit Hafer gefüttert werden, rascher und besser Antikörper liefern als Kontrolltiere, die nur Grünfutter und Kartoffeln erhielten. Wenn irgend möglich, setzen wir daher unsere Antiserumkaninchen zunächst 10 Tage auf Haferfütterung, bevor die Immunisierung begonnen wird. Die Mehrkosten machen sich durch die geringere Zahl von Versagern und übergreifenden, d. h. unbrauchbaren Antiseren sowie durch Ersparnisse an Zeit reichlich bezahlt, nachdem die Kaninchen so kostspielige Wertobjekte geworden sind.

Nach unseren Erfahrungen erklären sich die heterologen Trübungen, die man zu gewissen Jahreszeiten gelegentlich in so störender Häufigkeit auftreten sieht, hauptsächlich dadurch, daß die Behandlungsdauer der Antiserumtiere sich zu sehr in die Länge gezogen hat. Dabei kann man zwar manchmal auch sehr hohe Titer erzielen, aber die Spezifität eines Antiserums nimmt mit der Immunisierungsdauer häufig doch entschieden ab. Ob diese Erklärung auch für die Angabe bei Friedberger und Collier (5) zutrifft, daß bei ihnen die Häufigkeit des Uebergreifens in der letzten Zeit ganz beträchtlich zugenommen habe, entzieht sich unserer Kenntnis, aber es liegt nahe, an diese Möglichkeit zu denken.

Auf die Bedeutung der sogenannten Opaleszenz der Antisera als Quelle der Vortäuschung von heterologen Trübungen soll hier nicht eingegangen werden, da wir den Hinweisen Uhlenhuths und seiner Mitarbeiter nichts Neues hinzufügen können.

Dagegen möchten wir zum Schluß, obgleich nicht eigentlich zum Thema gehörig, auf eine andere Quelle der Täuschung hinweisen, die bei gelegentlichen Beanstandungen unserer Antisera als Ursache festgestellt worden ist. Viele Antisera setzen trotz Berkefeld-Filtration in den zugeschmolzenen Abgaberöhrchen im Laufe der Zeit einen Bodensatz ab, der beim Aufschütteln die ganze Probe trübt und den Verdacht der

bakteriellen Verunreinigung erweckt. Durch scharfes Ausschleudern werden diese Antisera im Gegensatz zu den bakteriell verunreinigten wieder ganz klar und brauchbar. Bei solchen Antiseren wird öfter beanstandet, daß sie sich nicht klar zentrifugieren lassen oder daß sie übergreifen, was wir bei der Nachprüfung meist nicht bestätigen können. Offenbar erklärt sich die Unstimmigkeit dadurch, daß keine genügende Ausschleuderung stattgefunden hat, entweder weil die Leistungsfähigkeit der Zentrifuge nicht ausreichte, oder aus anderen Gründen. Solche mangelhaft zentrifugierten Antisera zeigen dann zwar makroskopisch eine „Klärung", aber bei der Reaktion sind sie gleichwohl die Ursache von unspezifischen Trübungen. Manchmal ist der Vorgang auch so, daß zwar genügend zentrifugiert, aber beim Abpipettieren ein Teil des Bodensatzes wieder aufgewirbelt wird; die höheren Preise für Antisera verleiten jetzt mehr als früher zur restlosen Ausnützung des Antiserums, wobei ein Bodensatz im Abgaberöhrchen störend empfunden wird.

Aus allen diesen Beobachtungen ergeben sich folgende Ratschläge für den Untersucher:

1) Nicht nur die offensichtlich trüben Antisera vor dem Gebrauch zentrifugieren, sondern grundsätzlich jedes Antiserum.

2) Möglichst scharf zentrifugieren, je nach Leistungsfähigkeit der Zentrifuge, die bei den elektrisch betriebenen meist besser ist.

3) Beim Abpipettieren sehr vorsichtig verfahren, um den etwa vorhandenen oft nur geringen Bodensatz nicht in die Pipette zu bekommen.

Um diese letztere Manipulation, die sich mit sparsamster Verwendung des Antiserums häufig schwer vereinigen läßt, zu erleichtern, wird das Antiserum von der bakteriologischen Abteilung des Reichsgesundheitsamtes neuerdings in Röhrchen abgegeben, die zu einem kapillaren Ansatz ausgezogen sind, wie die beigegebene Abbildung zeigt. In diesem Ansatz sammelt sich beim Zentrifugieren der Bodensatz an und bleibt andererseits auch dann dort unberührt liegen, wenn man die

$^2/_3$ nat. Gr.

Pipette bis auf den Boden des Röhrchens eintaucht; der Inhalt des Röhrchens kann so bis zum letzten Tropfen abgesaugt werden, ohne sich wieder zu trüben.

Die Röhrchen werden von der Firma Altmann, Berlin NW 6, Luisenstraße 47, angefertigt.

Literatur.

1) Uhlenhuth, Das biologische Verfahren zur Erkennung und Unterscheidung von Menschen- und Tierblut. Jena 1905.
Uhlenhuth und Weidanz, Praktische Anleitung zur Ausführung des biologischen Eiweißdifferenzierungsverfahrens. Jena 1909.
Uhlenhuth und Steffenhagen, Die biologische Eiweißdifferenzierung mittelst der Präzipitation unter besonderer Berücksichtigung der Technik. Handb. d. pathog. Mikroorganismen von Kolle und Wassermann, 2. Aufl., Bd. 3, 1913.
2) Reeser, Sérums précipitants hétérologues. Mededeelingen van de Rijksseruminrichting, Afl. 2, Deel II, 1919. Revue générale de médicine vétérinaire, T. 29, No. 347. Referat: Berl. tierärztl. Wochenschr., 1920, No. 24.
3) Titze, Der jetzige Stand der Eiweißdifferenzierung mit Hilfe biologischer Methoden. Uebersichtsreferat in der Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg., 1921, H. 17.
4) Forssman, Biochem. Zeitschr., Bd. 37, 1911.
5) Friedberger und Collier, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 28, 1919.
6) Friedberger und Jarre, ebenda, Bd. 30, 1920.
7) Neumark, Med. Klinik, Bd. 15, 1919, H. 48.
8) Nuttall, Blood immunity and blood relationship etc. Cambridge 1904.
9) Friedberger und Goretti, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 21, 1914.
10) Rickmann, Arbeiten a. d. Kgl. Inst. f. experiment. Therap. in Frankfurt a. M., Jena 1907, H. 3.
11) Bauer, ebenda.
12) Sachs und Bauer, ebenda.

[Aus der bakteriol.-hygienischen Abteilung (Abteilungsvorsteher: Prof. Dr. H. Braun) des Hygienischen Universitäts-Instituts in Frankfurt a. M.]

Ungleichartige Ernährung als Ursache wechselnder Empfindlichkeit und veränderter antigener Eigenschaften der Bakterien.

Von Dr. med. **C. E. Cahn-Bronner,**
Assistent am Institut.

(Eingegangen bei der Redaktion am 18. August 1921.)

A. Besonderheiten der Ernährung in einfachsten, künstlichen Nährböden.

Untersucht man die Ernährungsbedürfnisse pathogener Bakterien, so findet man, daß zahlreiche Arten in unseren üblichen Nährböden mehrerlei verschiedene und komplizierter gebaute Nährstoffe finden, als sie zum Wachstum nötig haben. Es zeigt sich, daß einige Arten schon aus recht einfachen und wenigen Bausteinen, andere nur aus komplizierten Verbindungen ihre Körpersubstanzen aufbauen können.

Die synthetischen Fähigkeiten der Typhus- und Paratyphus-B-Bazillen sind zuletzt von H. Braun und C. E. Cahn-Bronner[1]) systematisch untersucht worden. Dabei hat sich herausgestellt, daß der Paratyphus B-Bazillus und seine

1) H. Braun und C. E. Cahn-Bronner, Centralbl. f. Bakt., Abt. I Orig., Bd. 86, 1921, Heft 1, 3 u. 5.

nächsten Verwandten, Gärtner-, Voldagsen- und Mäusetyphusbazillen bei Sauerstoffanwesenheit ihren Stickstoffbedarf aus Ammoniumsalzen, ihren Kohlenstoff- und Energiebedarf aus einfachen Kohlen-Wasserstoffverbindungen zu decken vermögen. Außerdem wurde ihnen noch Kochsalz und ein phosphorsaures Salz geboten. Aus diesen wenigen Bausteinen können sie dauernd in zahlreichen Generationen hintereinander ihre Leibessubstanz aufbauen. Eine der einfachsten organischen Substanzen, welche, neben Ammoniak als Stickstoffquelle, noch üppiges Wachstum gewährleisten, ist die Milchsäure. Ein solcher Nährboden enthält nur die zu kräftiger Vermehrung dieser Bakterien unbedingt nötigen Nährstoffe. Bleibt die Stickstoff- oder die Kohlenstoff- oder die Phosphorverbindung weg, so tritt darin kein Wachstum mehr auf. Bestimmt man außerdem, wieviel von jeder Substanz nicht zum Wachstum überhaupt, sondern zu rascher und ausgiebiger Vermehrung vorhanden sein muß, so kommt man z. B. zu folgendem Nährgemisch:

0,5 Proz. Kochsalz,
0,2 „ Kaliumbiphosphat,
0,6 „ Ammoniumlaktat.

Darin wird also dem Paratyphus B-Bazillus nach Art und Menge nur das **Unentbehrliche** und das in der **einfachsten chemischen Form** geboten.

Diese einfache Nährlösung ist nun in verschiedener Hinsicht andersartig zusammengesetzt als unsere üblichen Nährböden, z. B. eine Nährbouillon, welche ja im wesentlichen eine Fleischabkochung mit Zusatz von Pepton ist: Erstens besteht das obige Salzgemisch aus einfachen und bekannten chemischen Körpern. Seine Zusammensetzung ist also qualitativ und quantitativ konstant, während die Nährstoffe in einer Bouillon sehr komplizierte und nicht im gleichen Sinne chemisch definierte Verbindungen sind, deren Art und Menge überdies je nach dem Ausgangsmaterial, aus dem die Fleischabkochung und das Pepton gewonnen sind, schwanken. Zweitens fehlen diesem einfachen Nährboden eine Anzahl chemischer Elemente oder sind nur in den trotz der getroffenen Vorsichtsmaßnahmen unvermeidlichen Spuren vorhanden, Stoffe, welche in einer Nährbouillon immer anzutreffen

sind. Das sind z. B. Sulfate und die Salze des Kalziums, des Magnesiums und des Eisens. Drittens enthält das künstliche Nährgemisch nur je eine Verbindung der zum Leben notwendigen Elemente: Stickstoff, Kohlenstoff und Phosphor, während in einer Nährbouillon zahlreiche verschiedenartige Stickstoff- und zahlreiche verschiedenartige Kohlenstoffquellen verfügbar sind. Daraus geht hervor, daß der Stoffwechsel in einem derartigen, aus wenigen einfachen Substanzen zusammengesetzten Nährboden viel übersichtlicher und leichter verfolgbar ist, als in einer Bouillon mit ihrem Gemenge zahlreicher verschiedener und zum Teil komplizierter chemischer Körper. Außerdem aber ergibt sich, daß der Ablauf des Stoffwechsels in diesem Milchsäure-Ammoniak-Nährboden, wie wir ihn der Kürze halber nach der Stickstoff- und Kohlenstoffquelle bezeichnen wollen, ein anderer sein muß, als in der Nährbouillon. Er ist in dem einfachen Nährgemisch dadurch besonders ausgezeichnet, daß die Bindung des Stickstoffs an Kohlenstoff erst von den Bakterien selbst vollzogen werden muß, während sich in einer Bouillon bereits organische Stickstoffverbindungen vorfinden. Es werden in einem derartigen einfachen künstlichen Nährboden also ganz besondere Ansprüche an die synthetischen Fähigkeiten der Bakterien gestellt. Bedenkt man andererseits, wie reich unsere gebräuchlichen Nährböden an energiespendenden Verbindungen sind und wie sich darin das Bakterienwachstum vor allem in Spaltungen dieser Körper äußert, wie im Gegensatz dazu im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden die Milchsäure außer der Kohlenstoffquelle wohl die einzige Energiequelle ist, so läßt sich der unterschiedliche Ablauf des Stoffwechsels in diesen beiden Typen verschiedener Nährböden folgendermaßen ausdrücken: Im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden muß das Bakterium weitgehende Synthesen aus wenigen einfachsten Bausteinen bei knappen Energievorräten vollbringen, in einer Nährbouillon hingegen kommt es mit einfacheren Synthesen aus zahlreicheren komplizierteren Bausteinen bei weitgehenden Spaltungen mit gleichzeitigem reichlichen Energiegewinn aus. In diesen beiden Nährböden steht also der Bedarf an Energie im umgekehrten Verhältnis zu dem Vorrat an Energie. Die

Ansprüche, die an das Bakterium gestellt werden, sind beide Male ganz verschieden groß.

So haben wir die Möglichkeit, ein und denselben Bakterienstamm unter energetisch und chemisch ganz differenten Ernährungsbedingungen zu beobachten. Es erhebt sich die Frage, ob dabei Unterschiede im biologischen Verhalten dieser verschieden ernährten Keime auffindbar werden.

Daß die Bakterien in diesen aus einfachen Körpern zusammengesetzten Nährböden ein erhöhtes Sauerstoffbedürfnis zeigen, und daß fakultative Anaërobier, wie z. B. Paratyphus-B-Bazillen, die im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden bei reichlicher Luftzufuhr üppig wachsen, sich darin anaërob überhaupt nicht vermehren können, wurde bereits früher gezeigt [H. Braun und C. E. Cahn-Bronner[1])].

Diese Erscheinung steht in direkter Beziehung zum Stoffwechsel und ist ein Ausdruck für den Mehrverbrauch an Energie im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden. Jetzt soll untersucht werden, ob solche Eigenschaften der Mikroorganismen, von denen uns eine derartig einfache Beziehung zum Stoffwechsel nicht bekannt ist, bei unterschiedlich ernährten Kulturen desselben Stammes Verschiedenheiten aufweisen.

Eine Beantwortung dieser Frage soll auf zwei Wegen versucht werden: Die verschieden ernährten Keime sollen erstens in ihrem Verhalten gegen schädigende chemische und physikalische Einflüsse verglichen werden. Dabei können die ungleichartigen Stoffwechselvorgänge als solche dadurch Unterschiede bedingen, daß der auf differentem Wege vor sich gehende Aufbau des Bakterienleibes verschieden stark beeinträchtigt wird; ob dabei bestimmte chemisch-physiologische Vorgänge leichter störbar sind als andere, sollen einleitende Versuche feststellen. Der eigentliche Gegenstand der Untersuchung soll aber die Frage sein, ob die Bakterien selbst, deren Leibessubstanz aus so verschiedenartigen Bausteinen entstanden ist, nach vollendeter Entwicklung gegen chemische und physikalische Schädlichkeiten empfindlicher geworden sind, so daß man

1) H. Braun und C. E. Cahn-Bronner, Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 86, 1921, H. 5.

Unterschiede in ihrer inneren Struktur anzunehmen hätte. Zweitens sollen ihre antigenen Eigenschaften, eben weil sie der feinste Ausdruck ihrer stofflichen Zusammensetzung sind, nach Ausbildung unter verschiedenen Ernährungsbedingungen vergleichend untersucht und so über Art und Ausdehnung von Strukturverschiedenheiten Aufschluß gewonnen werden.

Es wurden dazu Paratyphus B- und Gärtner-Bazillen gewählt. Denn die Bedingungen, unter denen sich diese aus einfachen chemischen Körpern vermehren, waren aus früheren Untersuchungen bekannt. Als Beispiele von verschiedenartiger Ernährung wurden Nährbouillon und der oben angegebene Milchsäure-Ammoniak-Nährboden gewählt, die beiden Nährböden, deren chemische und energetische Differenzen soeben ausführlich dargelegt wurden.

B. Allgemeines über die Methodik der Züchtung in einfachen künstlichen Nährböden.

Es ist zum Verständnis der folgenden Versuche notwendig, einige Angaben über Darstellung dieses Milchsäure-Ammoniak-Nährbodens und über die Züchtung der Bakterien in solchen einfachen Nährgemischen zu machen, trotzdem solche früher bereits veröffentlicht wurden [H. Braun und C. E. Cahn-Bronner[1])].

Zur Vermeidung unerwünschter chemischer Beimengungen wurden die Nährsalze in der reinsten käuflichen Form von Merck in Darmstadt bezogen, in einem Wasser, das mehrmals, zuletzt in einem Bergkristallapparat destilliert war, gelöst und in Gefäßen aus Jenaer Glas aufbewahrt. Die Lösung von Kochsalz und Kaliumbiphosphat wurde mit Natron- oder Kalilauge oder mit Natriumbikarbonat in Substanz gegen Lackmus neutralisiert und dann durch einstündiges Kochen sterilisiert. Das Ammoniumlaktat wurde für sich allein in Wasser gelöst, eine Stunde gekocht und erst nach dem Erkalten den anderen Salzen beigefügt. Da auch in solchen Nährböden, wie in einer Bouillon, für den Paratyphus B-Bazillus eine schwach alkalische Reaktion optimales Wachstum gestattet, so wurden zum Schlusse mittels steriler Pipette auf 100 Teile des lackmusneutralen Nährbodens 0,7 Teile einer vorher sterilisierten, aus einwandfreiem Wasser und Chemikalien hergestellten Normallösung von Natron- oder Kalilauge oder Natriumbikarbonat hinzugefügt. Die in diesen Versuchen benutzte Nährbouillon zeigte genau den gleichen Alkaleszenzgrad.

Ein üppiges Wachstum des Paratyphus B-Bazillus in solchen einfachen künstlichen Nährböden wird nur durch eine besonders reichliche

1) H. Braun und C. E. Cahn-Bronner, Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 86, 1921, H. 1.

Sauerstoffzufuhr ermöglicht. Diese wurde durch Züchtung in flacher Schicht am Boden kleiner Erlenmeyerkölbchen erzielt, indem man etwa 4—5 ccm des flüssigen Nährbodens in ein 50 oder 100 ccm fassendes Kölbchen gab. Diese Kulturen wurden während der Bebrütung durch Einstellen in ein größeres, dickwandiges Glas, dessen Boden mit wassergetränkter Watte belegt war, gegen Verdunstung geschützt.

Bei solchem Vorgehen wächst der Paratyphus B-Bazillus in 12 bis 24 Stunden von wenigen eingesäten Keimen zu milchiger Trübung des Nährbodens heran und läßt sich in beliebig zahlreichen Passagen dauernd weiter züchten. Alle die zu besprechenden Versuche sind mit der 20. bis 100. Passage in diesem Nährboden angestellt. Es sind also Beimengungen von Substanzen, die bei der erstmaligen Beimpfung aus einem Bouillonröhrchen übertragen worden sind, oder Reservestoffe im Leib der Bakterien, die aus der Zeit ihres Lebens in der Nährbouillon stammen, ausgeschlossen.

Selbstverständlich wurde peinlichst auf Reinkultur der betreffenden Bakterienart geachtet.

Daß die Versuchsanordnung nicht genügt, Spuren der nicht zugesetzten chemischen Elemente, wie z. B. von Magnesium, auszuschließen, ist ohne weiteres anzunehmen (Glasgefäße!). Mit dieser Einschränkung als chemisch rein sind aber auch nur flüssige, agarfreie Nährböden zu betrachten. Diese wurden deshalb zu allen Versuchen benützt. Feste Nährböden mit Agarzusatz wurden nur dann herangezogen, wenn große Mengen von Bakterien nötig waren. Das geschah aber nur dann, wenn eine Vorprüfung ergeben hatte, daß auch bei diesen betreffenden Versuchen die im flüssigen und im festen Milchsäure-Ammoniak-Nährboden aufgewachsenen Keime gleiches Verhalten zeigten. Die festen Nährböden wurden so gewonnen, daß Stangenagar mehrere Tage lang mit oftmals gewechseltem destilliertem Wasser extrahiert und davon $2^1/_2$ Teile Trockengewicht auf 100 Teile Milchsäure-Ammoniak-Nährboden gegeben wurden.

C. Einleitende Versuche: Die Wachstumshemmung der Bakterien als Störung des assimilatorischen Stoffwechsels.

Mit Hilfe der oben gekennzeichneten, einfachen künstlichen Nährböden, die nur chemisch definierte Substanzen enthalten, ist man imstande, Keime eines und desselben Bakterienstammes zu ganz verschiedenen chemischen Leistungen zu veranlassen. Damit ist die Möglichkeit gegeben, zu untersuchen, ob diese ungleichartigen Stoffwechselprozesse durch Schädigungen chemischer Natur in verschiedenem Maße beeinflußbar sind. —

Kann man die entwicklungshemmende Wirkung von Giften auf eine Störung des Bakterienstoffwechsels zurück-

führen, die zwar das Leben nicht unterbindet, wohl aber den Aufbau von Leibessubstanz verhindert? Und ist es möglich, aus Hemmungsversuchen Aufschluß über eine stärkere oder geringere Störbarkeit verschiedener Stoffwechselvorgänge zu gewinnen?

Im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden wächst der Paratyphus B-Bazillus, wie Keimzählungen ergaben, ungefähr ebenso üppig wie in einer Bouillon. Er findet darin also alle zur Vermehrung notwendigen Substanzen, hat aber, wie wir sahen, eine ungleich größere Arbeitsleistung zum Aufbau seiner Körpersubstanzen zu vollbringen. Da ja bekannt ist, daß die Entwicklung von Bakterien desto schwerer gehemmt wird, je günstiger ihre Lebensbedingungen sind, so war natürlich zu erwarten, daß bereits geringere Konzentrationen von Desinfektionsmitteln das Wachstum im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden zu hindern vermögen als in einer Nährbouillon. Ein Blick auf die Tabelle I zeigt, daß tatsächlich diese Erscheinung mit Giften ganz verschiedenartiger Natur zu beobachten ist. So wird die Vermehrung im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden von einer 4—7-fach geringeren Konzentration salzsauren Chinins oder salizylsauren Natriums hintan gehalten als das Wachstum in einer Bouillon. Beim Phenol geht dieser Unterschied auf die Hälfte bis ein Drittel zurück, bei einem Vertreter der intravitalen Farbstoffe, dem Trypaflavin, beträgt er wiederum ungefähr das 5-fache. Diese 4 genannten Desinfizientien wirken molekular und werden in ihrer Wirksamkeit durch Nährbodenbestandteile nur wenig, oder, wie das z. B. vom Trypaflavin angegeben wird, sogar durch Eiweißlösungen überhaupt nicht beeinträchtigt, was natürlich für derartige vergleichende Versuche wichtig ist. Anders liegen die Verhältnisse bei dem im ionisierten Zustand wirkenden Sublimat. Auch hiervon genügen geringere Mengen, um die Vermehrung im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden zu hemmen als in einer Bouillon, doch beeinflußt ja das Lösungsmittel sehr wesentlich die Zahl der Quecksilberionen, so daß der in Tabelle I verzeichnete außerordentlich große, das 500-fache betragende Unterschied der in den beiden Nährböden wirksamen Sublimatmengen aus zwei Faktoren zusammengesetzt ist, einem rein chemischen, der Umsetzung

Tabelle I.

Der entwicklungshemmende Einfluß mehrerer Desinfektionsmittel auf Paratyphus B-Kulturen unter verschiedenartigen chemischen und energetischen Wachstumsbedingungen.

Verdünnungen des Desinfektionsmittels	1:100	1:200	1:400	1:500	1:750	1:1000	1:2000	1:2500	1:4000	1:5000	1:10 000	1:20 000	1:50 000	1:100 000	1:250 000	1:500 000	1:1 Million	1:2,5 Million.	1:5 Million.	1:10 Million.	1:25 Million.	1:50 Million.	Kontrolle
Wachstum in:	mit Phenol																						
Bouillon	.	.	—	—	+	+	+	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+
Milchsäure-Ammoniak-Nährboden	.	.	—	—	—	—	+	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+
	mit salizylsaurem Natrium																						
Bouillon	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+
Milchsäure-Ammoniak-Nährboden	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+
	mit salzsaurem Chinin																						
Bouillon	.	.	.	—	+	+	+	+	+	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+
Milchsäure-Ammoniak-Nährboden	.	.	.	—	—	—	—	+	+	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+
Milchsäure-Ammoniak-Nährboden mit 0,5 Proz. Na_2SO_4	.	.	.	—	—	—	—	+	+	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+
Milchsäure-Ammoniak-Nährboden mit 1 Proz. Traubenzucker	.	.	.	—	—	—	—	+	+	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+
Milchs.-Ammoniak-Nährboden mit 0,5 Proz. Glutaminsäure	.	.	.	—	—	—	+	+	+	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+
Milchs.-Ammon.-Nährboden mit 0,5 Proz. Pepton-Chapoteaut	.	.	.	—	—	+	+	+	+	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+
	mit Trypaflavin																						
Bouillon	.	.	.	.	.	.	.	.	—	+	+	+	+	+	+	+	.	.	.	.	.	.	+
Milchsäure-Ammoniak-Nährboden	.	.	.	.	.	.	.	.	—	—	—	—	+	+	+	+	.	.	.	.	.	.	+
Milchsäure-Ammoniak-Nährboden mit 0,5 Proz. Na_2SO_4	.	.	.	.	.	.	.	.	—	—	—	+	+	+	+	+	.	.	.	.	.	.	+
Milchsäure-Ammoniak-Nährboden mit 1 Proz. Traubenzucker	.	.	.	.	.	.	.	.	—	—	—	—	+	+	+	+	.	.	.	.	.	.	+
	mit Sublimat																						
Bouillon	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Milchsäure-Ammoniak-Nährboden	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
Milchsäure-Ammoniak Nährboden mit 0,5 Proz. Na_2SO_4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
Milchsäure-Ammoniak-Nährboden mit 1 Proz. Traubenzucker	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
Milchs.-Ammon.-Nährboden mit 1 Proz. Pepton-Chapoteaut	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+

des Desinfektionsmittels mit Nährbodenbestandteilen, und einem biologischen, dem leichter störbaren Stoffwechsel im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden. Ein solcher Versuch sagt über die Größe der einzelnen Faktoren und damit der biologischen Differenz nichts aus. Jedenfalls aber ist bemerkenswert, daß so ganz verschiedenartige Gifte, wie die besprochenen Substanzen, deren Wirkung doch sicher sehr verschiedene Angriffspunkte hat, trotzdem ganz gleichsinnig einen erheblich empfindlicheren Stoffwechsel im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden erkennen lassen.

Die Uebersichtlichkeit der Ernährungsbedingungen in den einfachen, nur wenige bekannte Substanzen enthaltenden Nährböden gestattet es nun, zu analysieren, welche Art von Prozessen es ist, die diesen Unterschied in der Beeinflußbarkeit des Stoffwechsels bedingen. Die Frage lautet mit anderen Worten: Welche chemischen Verbindungen sind es, die in der Bouillon enthalten sind, deren Fehlen im einfachen, künstlichen Nährboden aber den Stoffwechsel so lädierbar machen? Was also muß man dem Milchsäure-Ammoniak-Nährboden zusetzen, damit die Vermehrung der Paratyphus B-Bazillen nicht mehr so leicht hintangehalten wird?

Was die Technik dieser, wie der eben besprochenen vergleichenden Versuche anbelangt, so wurden fallende Konzentrationen des Desinfektionsmittels hergestellt, wobei gleiches Gesamtvolum jeweils durch Auffüllen mit dem betreffenden Nährboden hergestellt wurde, um die Konzentration der Nährstoffe möglichst konstant zu erhalten. Diese 4 ccm Flüssigkeit wurden am Boden kleiner Erlenmeyerkölbchen ausgebreitet. Da, wie eingangs besprochen, die Größe der Sauerstoffzufuhr bei den einfachen künstlichen Nährböden für das Wachstum eine sehr bedeutende Rolle spielt, mußte diese bei allen derartigen Versuchen, bei denen die Vermehrung der Keime im künstlichen Nährboden Gegenstand der Beobachtung war, gleichgroß gestaltet und auch bei der Bouillon beibehalten werden. Um auch die Einsaat gleich groß zu gestalten, wurden Keimzählungen vorgenommen und es ergab sich, daß 1 ccm einer 24-stündigen, in 0,5 cm hoher Schicht gewachsenen Milchsäure-Ammoniak-Kultur ungefähr ebensoviel lebende Keime enthielt, wie 1 ccm einer 24-stündigen Bouillonkultur, bei der die Flüssigkeitsschicht 8mal höher war. Von diesen Kulturen wurde 0,1 ccm oder auch gelegentlich 0,1 der 10-fach verdünnten Kultur eingesät, so daß also in gleicher Flüssigkeitsmenge die gleiche Zahl lebender gleichartiger Keime enthalten war. 2—3 Tage alte Kulturen erwiesen sich als nur unbedeutend widerstandsfähiger als 24-stündige. Die Versuche wurden mit der 23.—51. Passage von Paratyphus B-Bazillen im

Milchsäure-Ammoniak-Nährboden ausgeführt. Alle verwendeten Nährböden hatten den gleichen Alkaleszenzgrad.

Die Bebrütung der Hemmungsversuche dauerte 7 Tage.

Es war zunächst an einen Einfluß der im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden fehlenden oder darin nur in Spuren, in der Nährbouillon aber reichlich vorhandenen chemischen Elemente zu denken. Vielleicht konnten die Bakterien Stoffe irgendwelcher Art nicht bilden, wenn es ihnen z. B. an Schwefel oder Magnesium fehlte. Deshalb wurden zunächst 0,5 Proz. Natriumsulfat oder 0,1 Proz. Magnesiumsulfat zugefügt. Wie aus der Uebersicht über einen Teil dieser Versuche aus Tabelle I hervorgeht, blieb aber trotzdem der Unterschied zwischen den in Bouillon und im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden zur Entwicklungshemmung notwendigen Chinin- oder Sublimatmengen vollauf bestehen. Dieses Resultat wird verständlich durch die früher gemachte Erfahrung, daß Sulfate oder Magnesium-, Kalzium- oder Eisensalze einzeln oder kombiniert dem Milchsäure-Ammoniak-Nährboden zugesetzt, das Wachstum des Paratyphus B-Bazillus, was Schnelligkeit der Vermehrung anbelangt, nicht nachweisbar verbessert. Daraus war der Schluß zu ziehen, daß dieses Bakterium die genannten Elemente, wenn überhaupt, so nur in den geringsten Spuren nötig hat. Hier sehen wir, daß dadurch auch die Stoffwechselverhältnisse des Paratyphus B-Bazillus nicht denen in einer Nährbouillon ähnlicher werden. Setzt man nun aber dem Milchsäure-Ammoniak-Nährboden eine zweite Energiequelle in Form einer leicht angreifbaren organischen Substanz, z. B. Traubenzucker zu, so wird dadurch die Vermehrung der Keime bedeutend üppiger. Deshalb wurde auch bei diesen Hemmungsversuchen dem Milchsäure-Ammoniak-Nährboden 1 Proz. Traubenzucker zugesetzt, um zu prüfen, ob in diesem sehr beträchtlich verbesserten Nährboden eine Entwicklungshemmung erst mit größeren Mengen des Desinfektionsmittels gelänge und so eine Annäherung an die Verhältnisse in einer Bouillon zu erzielen sei. Trotzdem aber zeigte sich, daß dabei dieselbe Menge von Chinin oder Trypaflavin oder Sublimat zur Wachstumshemmung nötig war, als ohne Traubenzucker, die Resultate schwankten höchstens innerhalb der Fehlergrenzen der Versuche, und die

Differenz bestand zwischen Bouillon und dem verbesserten Milchsäure-Ammoniak-Nährboden unverändert fort. Erst bei Zusatz von organischen Stickstoffverbindungen begann sich dieser Unterschied auszugleichen. Betrug die zur Wachstumshemmung nötige Chininmenge während der Ernährung in Bouillon das 5-fache als im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden, so war nach Zusatz einer Aminosäure, und zwar 0,5 Proz. Glutaminsäure, zum Milchsäure-Ammoniak-Nährboden nur noch die doppelte notwendig. Gab man vollends 0,5 Proz. Pepton Chapoteaut, ein chemisch ja nicht mehr streng definiertes Präparat, hinzu, so ging die Differenz zwischen Bouillon und dem so verbesserten Milchsäure-Ammoniak-Nährboden fast ganz zurück, so daß sie meist innerhalb der Fehlergrenze lag.

Wir haben also bei Zusatz von Traubenzucker gesehen, daß eine Verbesserung der Ernährungsbedingungen schlechthin, z. B. Vermehrung der Energiequellen, nicht genügt, um die Empfindlichkeit des Stoffwechsels beim Aufbau aus einfachen Substanzen zu verringern. Erst wenn man Körper hinzufügte, welche den Bakterien im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden die Leistung, selbsttätig Stickstoff an Kohlenstoff zu binden, ersparten, näherten sich die Verhältnisse denen in einer Bouillon. Dies Resultat erinnert an Versuche von Braun und Cahn-Bronner[1]) über die Bedingungen anaëroben Wachstums in solchen einfachen künstlichen Nährböden. Auch da genügte der Zusatz einer zweiten Energiequelle, des Traubenzuckers, zum Milchsäure-Ammoniak-Nährboden nicht, um anaërobe Vermehrung zu gewährleisten. Es mußte ein vorgebildeter Baustein, das Tryptophan, und dies mit Traubenzucker zusammen, zugesetzt werden, um Wachstum ohne Sauerstoff zu ermöglichen. Auch dabei also zeichneten sich die notwendigen Zusätze u. a. dadurch aus, daß den Bakterien die mühsame Herstellung der organischen Stickstoffbindung erspart wurde.

Wir sehen also aus diesen einleitenden Versuchen, daß je weitgehender der Aufbau ist, den das Bakterium zu vollbringen hat, es desto leichter in seiner Entwicklung gehemmt

---

1) l. c.

wird, daß also nicht die Spaltung, sondern in erster Linie die **Synthesen** von den Desinfektionsmitteln verhindert werden. Die assimilatorische Seite des Stoffwechsels ist es, die sogar durch das Chinin, von dem man bei hochorganisierten Tieren eine Lähmung gerade der dissimilatorischen Prozesse anzunehmen gewohnt ist, in erster Linie betroffen wird. Diese Tatsache ist für die Theorie der Giftwirkung und der Entwicklungshemmung bedeutungsvoll, denn sie präzisiert die bekannte Beobachtung, daß die Desinfektionsmittel unter besseren oder schlechteren Ernährungsbedingungen der Bakterien schwächer oder stärker wirken dahin, daß es in erster Linie die Synthesen sind, bei welchen die Stoffwechselstörung angreift. Diesen Gesichtspunkt der Beziehung zwischen assimilatorischen Stoffwechselvorgängen und der Wirkung der Desinfektionsmittel wird man auch im Auge behalten müssen, wenn man aus Laboratoriumsversuchen auf den Erfolg irgendwelcher praktischer antiseptischer oder therapeutischer Maßnahmen Schlüsse ziehen will.

Die besprochenen Versuche sagen nun über den Zustand der Bakterien selbst gar nichts aus. Denn es wurden jeweils die im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden aufgewachsenen Keime in den künstlichen Nährboden und die einer Bouillon entstammenden Keime in die Bouillon eingesät. Stellte man nun die Versuche kreuzweise an, und gab die „Milchsäure-Ammoniak-Bakterien“ in Bouillon und die Bouillonkultur in den Milchsäure-Ammoniak-Nährboden, so stellte sich heraus, daß es im künstlichen Nährboden geringfügig größerer Mengen des Desinfektionsmittels zur Entwicklungshemmung der Bouillonkultur als der Milchsäure-Ammoniak-Kultur bedurfte. Trotzdem dieser Unterschied keineswegs markant ist, deutet er doch auf eine gewisse Differenz in der Empfindlichkeit der beiderlei Bakterien, nicht nur auf verschiedene Beeinflussung ungleichartiger Stoffwechselprozesse hin. Dagegen war in der Nährbouillon ein Unterschied zwischen Bouillon-Bakterien und Milchsäure-Ammoniak-Bakterien nicht zu beobachten, wohl deshalb, weil sich die Differenz zwischen den verschieden aufgezogenen Kulturen rasch ausgleicht, wenn die Ernährungsbedingungen für beide günstig werden.

Damit sind wir zu der eigentlichen Fragestellung gekommen, ob tatsächlich Bakterien, deren Leibessubstanz einmal aus wenigen einfachen, das andere Mal aus sehr zahlreichen verschiedenen und komplizierten Bausteinen entstanden ist, biologische Differenzen aufweisen und vielleicht in ihrer inneren Struktur Abweichungen voneinander zeigen. Ob das der Fall ist, und wieweit gegebenenfalls diese Abweichungen gehen, sollen die folgenden Versuche zeigen.

Erster Teil.

D. Die Empfindlichkeit verschieden ernährter Bakterien gegen schädigende chemische und physikalische Einflüsse.

I. Die Widerstandskraft gegen chemische Desinfektionsmittel.

Tötet man Bakterien innerhalb weniger Minuten durch Gifte ab, so spielt dabei in dieser kurzen Zeit der Ablauf ihrer Stoffwechselprozesse keine Rolle, sondern die Wirkung trifft die Keime so, wie sie sich unter den verschiedenen Ernährungsbedingungen aufgebaut haben. Zudem kann man die Bakterien aus ihrem Nährboden heraus in ein indifferentes Medium, z. B. Kochsalzlösung, übertragen, wodurch ja die Besonderheiten des Stoffwechsels in Bouillon und im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden unterbrochen werden. Findet man also bei derartigen Abtötungsversuchen Unterschiede zwischen Bouillon- und Milchsäure-Ammoniak-Bakterien, so sind diese nicht mehr wie bei den Hemmungsversuchen auf die Verschiedenheit der Stoffwechselvorgänge als solche, sondern auf die Bakterien selbst zu beziehen.

Die Versuche wurden mit dem im Ionenzustand wirksamen Sublimat begonnen. Chemische Umsetzungen des Desinfektionsmittels mit Nährbodenbestandteilen waren zu erwarten und drohten die Resultate zu verschleiern, da ja die zu vergleichenden Kulturen in verschiedenen Nährböden herangewachsen waren. Die Versuchsanordnung hatte also darauf Rücksicht zu nehmen und entweder die Größe dieses störenden Faktors zu bestimmen oder diesen auszuschalten.

Reihe I bis IV des einfachen Versuchsbeispieles in Tabelle II sollen darüber Rechenschaft geben, welcher Bruchteil der aufgefundenen Differenz zwischen den beiden ver-

schieden ernährten Kulturen auf veränderte Eigenschaften der Keime, welcher auf veränderte wirksame Sublimatmengen zurückzuführen ist. Es wurden deshalb die in Bouillon und im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden aufgewachsenen Kulturen jeweils in beiden Nährböden mit dem Sublimat zusammengebracht. Auf gleich große Einsaaten gleichaltriger Keime wurde geachtet. (Siehe die Ergebnisse der Keimzählungen auf p. 383.)

Tabelle II.

Versuch 47 (27. II. 20): Abtötung verschieden ernährter Paratyphus B-Bazillen durch Sublimat in ungleichartigen Medien.

	Reihe	I	II	III	IV	V	VI
		10 Tropfen Bouillonkultur		10 Tropfen Milchs.-Ammoniak-Kultur		10 Tropf. Bouillon-kultur	10 Tropf. Milchs.-Ammon.-Kultur
						in 0,85-proz. Kochsalzlösung mit	
		in 5 ccm Bouillon	in 5 ccm Milchs.-Ammon.-Nährboden	in 5 ccm Bouillon	in 5 ccm Milchs.-Ammon.-Nährboden	10 Tropf. sterilen Milchs.-Ammon.-Nährbodens	10 Tropf. steriler Bouillon
Konz. d. Subl.	1 : 20000	—	—	—	—	—	—
	1 : 50000	+	—	—	—	—	—
	1 : 100000	+	+	+	—	+	—
	1 : 200000	+	+	+	—	+	—
	1 : 500000	+	+	+	+	+	+
	Kontrolle	+	+	+	+	+	+

Zimmertemperatur. Versuchsdauer: 10 Minuten.

Ergebnis: Die im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden aufgewachsenen Keime werden in allen Medien von geringeren Sublimatmengen abgetötet als die Bouillonkultur desselben Stammes.

Daraus geht zunächst hervor, daß es in der Nährbouillon der doppelten Sublimatmenge bedarf, um den gleichen Effekt zu erzielen wie im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden. Das war sowohl bei den Bouillonbakterien wie bei der Milchsäure-Ammoniak-Kultur der Fall. Ein Vergleich von Reihe I mit Reihe IV sagt allein also über die biologische Frage der Empfindlichkeit verschieden ernährter Keime nichts Bindendes aus, weil sich dabei der Einfluß des Nährbodens auf die

Quecksilberionisation und die biologische Differenz summieren. Vergleicht man aber Reihe I mit III und Reihe II mit IV, so ergibt sich, daß die Widerstandskraft der aus verschiedenen Nährstoffen entwickelten Kulturen des gleichen Stammes gegenüber der abtötenden Wirkung des Sublimats verschieden ist.

Das gleiche Resultat liefern Reihe V und VI, wo der störende Einfluß des Nährbodens ausgeschaltet ist. Nach 24-stündiger Entwicklung in Bouillon resp. im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden wurden Keime in physiologische Kochsalzlösung als indifferentes Medium übertragen. Dazu wurde, wie des näheren aus dem Protokoll hervorgeht, bei Einsaat von gewachsener Bouillonkultur die gleiche Menge sterilen Milchsäure-Ammoniak-Nährbodens beigefügt und umgekehrt bei Einsaat von Milchsäure-Ammoniak-Kultur die gleiche Menge steriler Bouillon zugesetzt, um auf diese Weise die Keime unter möglichst gleichen chemischen und physikalischen Bedingungen dem Desinfektionsmittel auszusetzen, und wiederum waren die Milchsäure-Ammoniak-Bakterien dem Sublimat gegenüber empfindlicher als die Bouillon-Bakterien.

Gegenüber der als Molekül wirkenden Karbolsäure ließ sich mit der gleichen Versuchsanordnung keine erhöhte Empfindlichkeit der im Milchsäure-Ammoniak Nährboden aufgewachsenen Keime nachweisen; jedenfalls erreichte die zu ihrer Abtötung nötige Giftmenge nicht wie beim Sublimat das Doppelte oder mehr gegenüber den Bouillon-Bakterien. Trotzdem ließ sich die verschiedene Widerstandskraft der unterschiedlich ernährten Keime sehr deutlich zum Ausdruck bringen: Es wurde die Giftkonzentration bestimmt, welche die beiden Kulturen innerhalb 10 Minuten gerade nicht mehr abtötet und nun geprüft, ob die Zeit, welche bis zum Absterben der Keime verstreicht, verschieden ist. Während also bei den oben besprochenen Versuchen die Zeit konstant blieb, und die Konzentration des Giftes wechselte, war jetzt die Giftmenge gleich, und die Zeit wurde variiert.

Innerhalb 10 Minuten tötete 1-proz. Karbolsäure sowohl die Bouillon- als auch die Milchsäure-Ammoniak-Bakterien noch ab, 0,5-proz. Karbolsäure dagegen nicht mehr. Und zwar zeigte sich dies ganz gleichmäßig, ob die Bouillon-Bak-

terien in Bouillon oder im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden, oder ob die Milchsäure-Ammoniak-Bakterien im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden oder in Bouillon oder ob beide Kulturen in Kochsalzlösung dem Phenol ausgesetzt wurden. Es bleibt dieses also in seiner Wirkung von den Nährbodenbestandteilen weitgehend unbeeinflußt. Nun wurde untersucht, ob diese 0,5-proz. Karbolsäure bei längerer Einwirkung die beiderlei Kulturen verschieden beeinflußt. Das Versuchsbeispiel in Tabelle III zeigt einen solchen Versuch, in dem die verschieden ernährten Keime jeweils in ihrem eigenen Nährboden und in Kochsalzlösung mit dem Phenol zusammengebracht wurden. Die Bakterieneinsaaten waren gleich groß.

Tabelle III.

Versuch 43 (24. II. 20): Abtötung verschieden ernährter Paratyphus B-Bazillen durch 0,5-proz. Phenol in gleichen und verschiedenen Medien.

Zeit nach der Beimpfung	10 Tropfen Bouillonkultur in		10 Tropfen Milchs.-Ammoniak-Kultur in	
	5 ccm Bouillon mit 0,5 Proz. Phenol	5 ccm 0,85-proz. Kochsalzlösung mit 10 Tropfen Milchs.-Ammon.-Nährboden und 0,5 Proz. Phenol	5 ccm 0,85-proz. Kochsalzlösung mit 10 Tropfen Bouillon und 0,5 Proz. Phenol	5 ccm Milchs.-Ammon.-Nährboden mit 0,5 Proz. Phenol
sofort	+	+	+	+
15 Min.	+	+	+	+
30 „	+	+	—	eine Kolonie
1 Std.	+	+	—	—
3 „	+	+	—	—
4 „	+	+	—	—
5 „	—	eine Kolonie	—	—
$6^3/_4$ „	—	—	—	—

Zimmertemperatur. Zu den angegebenen Zeiten wurden jeweils ein Schrägagar- und ein Bouillonröhrchen mit 2 Oesen beimpft.

Ergebnis: 0,5 Proz. Phenol tötet die Bouillonkultur in 5—6 Stunden, die Milchsäure-Ammoniakkultur in $^1/_2$—1 Stunde ab.

Gleiche Mengen von Karbolsäure bedürfen also etwa der 5-fachen Zeit, um die in Bouillon aufgewachsenen Keime abzutöten, als die aus wenigen einfachen Bausteinen entwickelten. Die Versuchsanordnung schließt einen diese biologische Verschiedenheit vortäuschenden Einfluß der Nährbodenbestandteile auf das Desinfektionsmittel aus. In den beiden mittleren Kolumnen des Versuches waren gleiche Zahl gleichalter Bak-

terien im gleichen Medium aufgeschwemmt. Trotzdem in den oben erwähnten Versuchen das Phenol bei kurzer Einwirkung durch die gewählten Aufschwemmungsmittel unbeeinflußt blieb, wissen wir doch aus den Untersuchungen von Spiro und Bruns[1]), daß abgesehen von chemischen Umsetzungen gerade für Karbolsäure das die Bakterien umspülende Medium insofern von Bedeutung ist, als dadurch ihre Löslichkeitsverhältnisse und damit ihre Verteilung zwischen Bakterienzelle und Außenflüssigkeit beeinflußt wird. Davon war wie der Versuch zeigt, bei den Paratyphus B-Bazillen und den in Betracht kommenden Flüssigkeiten nichts zu sehen, die geringen Schwankungen liegen innerhalb der Fehlergrenzen solcher Versuche.

Es ergibt sich also bei verschiedenartiger Gestaltung der Versuchsanordnung und möglichster Ausschaltung der Versuchsfehler immer wieder dieselbe Erscheinung: Die Widerstandsfähigkeit der Bakterien gegen keimtötende chemische Einflüsse ist abhängig von der Art ihrer Ernährung. Wiederum spielen dabei die fehlenden Elemente, an die man immer wieder zu denken geneigt ist, wie Schwefel, Magnesium, Kalzium und Eisen keine Rolle. Denn ihr Zusatz zum Milchsäure-Ammoniak-Nährboden ändert an dieser Erscheinung nichts. Wiederum haben wir die mühsamen, ja im wesentlichen von 2 Salzen, einem Phosphat und milchsaurem Ammonium ausgehenden Synthesen und die gleichzeitig so knapp bemessenen Energievorräte dafür verantwortlich zu machen. Dieser verschiedene Zustand der Keime, der sich in größerer und geringerer Empfindlichkeit äußert, wird also durch die Art des Stoffwechsels, der zum Aufbau ihres Körpers geführt hat, hervorgerufen.

Daß die Bakterienzellen nach ihrer starken Beanspruchung gegen äußere Schädlichkeiten empfindlicher geworden sind, erscheint uns wegen der Analogie zu den Zellstaaten höherer Wesen nicht unwahrscheinlich. Unsere biologischen Anschauungen veranlassen uns für diese veränderten Eigenschaften eine veränderte materielle Grundlage anzunehmen. Dabei kann der

---

1) Spiro und Bruns, Arch. f. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 41, 1898, p. 355.

Aufbau des Bakterienleibes im qualitativen Sinne verändert sein, indem darin andersartige chemische Verbindungen vorhanden sind, oder aber es können quantitative Verschiebungen innerhalb der Zelle stattgefunden haben, so daß lediglich von einem Stoff mehr, von einem anderen weniger vorhanden ist. Beides könnte die Beobachtungen erklären. Doch läßt sich aus den bisher mitgeteilten Versuchen nicht entscheiden, welche von beiden Möglichkeiten hier zutrifft, so daß die Erörterung dieser Frage erst bei späteren Versuchen am Platze ist.

Wodurch kann überhaupt eine so verschiedene Widerstandskraft verursacht sein? Von mancherlei Erklärungsmöglichkeiten soll hier eine Erwähnung finden, welche besonders einfach ist und sich auf Beobachtungen stützt. Sie zeichnet sich außerdem dadurch aus, daß sie auch für spätere, auf anderem Gebiet liegende Tatsachen als Erklärung in Betracht kommt. Doch muß ausdrücklich betont werden, daß damit nur eine Möglichkeit zum Ausdruck gebracht werden soll, die wahrscheinlich neben anderen Faktoren eine Rolle spielen mag.

Die im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden und in Bouillon aufgewachsenen Paratyphus B-Bazillen weichen in ihrer Gestalt sehr prägnant voneinander ab, so daß man ihre Herkunft an ihrer Form erkennen kann. Wie dies früher von Braun und Cahn-Bronner[1]) beschrieben und abgebildet worden ist, sind die Milchsäure-Ammoniak-Bakterien meist 2- bis 3mal so lang und viel dünner und schlanker, als die Bouillonbakterien; sie sind im einfachen künstlichen Nährboden häufig gebogen und an den Enden zugespitzt, wohingegen sie in Bouillon abgerundete Enden zeigen. Aus dieser Formveränderung ergibt sich, daß ein Individuum im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden im Verhältnis zu seiner Masse eine größere Oberfläche haben muß als in Bouillon. Wird nun eine solche Zelle der Wirkung eines Desinfektionsmittels ausgesetzt, so kommt sie infolge ihrer Oberflächenvergrößerung mit mehr Giftmolekülen in Berührung, und es kann daher das Gift in die gleiche Masse Bakteriensubstanz schneller eindringen, als bei oberflächenkleineren Keimen. Auf diese

1) l. c.

einfache Weise kann sich wenigstens teilweise die erhöhte Empfindlichkeit der aus einfachen Bausteinen entwickelten Keime erklären.

Daß die gemachten Beobachtungen der verschiedenen Widerstandsfähigkeit unterschiedlich ernährter Keime eine gewisse Bedeutung für die Bestimmung der keimtötenden Kraft eines Mittels haben, geht aus dem Besprochenen hervor. Auch wenn man aus Reagenzglasversuchen auf bakterizide Wirkungen im Körper, sei es durch Arzneimittel, sei es durch die Produkte des Körpers selbst Schlüsse ziehen will, mag die Berücksichtigung der Stoffwechselprozesse der Keime im Auge behalten werden, denn es ist keineswegs gesagt, im Gegenteil sogar unwahrscheinlich, daß die Ernährungsverhältnisse der Bakterien im Körper etwa denen in unseren üblichen Nährböden gleichen.

II. Die Widerstandskraft verschieden ernährter Bakterien gegenüber entwicklungshemmender und abtötender Wirkung der Hitze.

Läßt sich auch gegenüber physikalischen Einflüssen eine erhöhte Empfindlichkeit der Keime, die eine schwere synthetische Arbeit leisten, nachweisen? Bei Schädigungen chemischer Natur hat es sich ja gezeigt, daß der Mechanismus des vorwiegend assimilatorischen Stoffwechsels leichter störbar ist, als ein mit weniger ausgedehnten Synthesen und reichlichen Energievorräten sich vollziehender Aufbau. Man pflegt die Einwirkung der Wärme auf die Bakterienzelle nicht allein durch eine Fällung des Protoplasmaeiweißes zu erklären, weil Temperaturen, bei denen das Eiweiß noch nicht sichtbar verändert wird, bereits zerstörend wirken können. Man neigt dazu, diese Schädigung wenigstens zum Teil durch eine Störung im Ablauf des Stoffwechsels zu erklären. Es soll deshalb hier zunächst untersucht werden, ob sich bei bestimmten Temperaturen diese chemischen Prozesse im Bakterienleib so stören lassen, daß es zu einer Entwicklungshemmung, aber nicht zum Tode der Keime kommt. Und es wird sich herausstellen, ob auch dabei die im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden heranwachsenden Keime empfindlicher sind, als die in einer Nährbouillon.

Einige Beispiele derartiger Versuche sind in Tabelle IV wiedergegeben, aus der auch die Versuchsanordnung hervorgeht.

Tabelle IV.

Versuch 60 (19. IV. 20): Entwicklungshemmung verschieden ernährter Paratyphus B-Bazillen durch Temperaturen, die unter und über dem Wachstumsoptimum liegen.

Tage nach der Beimpfung	15° C		22° C		45° C			48° C			Kontr. 37°
	in Bouillon	im Milchs.-Ammoniak-Nährboden	in Bouillon	im Milchs.-Ammoniak-Nährboden	in Bouillon	im Milchs.-Ammoniak-Nährboden	im Milchs.-Ammon.-Nährb. mit 0,1 Proz. $MgSO_4$, 0,05 Proz. $CaCl_2$ und Spur Eisen	in Bouillon	im Milchs.-Ammoniak-Nährboden	im Milchs.-Ammon.-Nährb. mit 0,1 Proz. $MgSO_4$, 0,05 Proz. $CaCl_2$ und Spur Eisen	im Milchs.-Ammoniak-Nährboden
1 Tag	+	—	+	—	+	—	—	+	—	—	+
2 Tage	.	—	.	—	.	—	—	.	—	—	.
3 „	.	—	.	+	.	—	—	.	—	—	.
4 „	.	+	.	.	.	—	—	.	—	—	.
8 „	.	.	.	.	.	—	—	.	.	.	.

Ergebnis: Bei 15° und 22° langsameres Wachstum im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden, als in Bouillon, bei 45° gutes Wachstum in Bouillon, keine Vermehrung im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden, bei 48° schnelles Wachstum in Bouillon, kein Wachstum im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden.

Betrachten wir zunächst den Einfluß der Temperaturen, die unter dem Optimum von 37° C liegt. Bei 15° und 22° wachsen, wie zu erwarten war, im einfachen Nährgemisch die Keime weit langsamer heran als in Bouillon. Es liegt nahe, anzunehmen, daß die mangelnde Wärmezufuhr bei den schon ohnehin ungewöhnlich knappen Energievorräten im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden im Sinne einer verminderten Energiezufuhr besonders ins Gewicht fällt. Jedenfalls aber ist es ein Ausdruck dafür, daß der schwierigere Aufbau der Leibesbestandteile schon von äußeren Verhältnissen beeinträchtigt wird, durch welche die Keime in einer Nährbouillon noch nicht nachweislich getroffen werden. Interessanter ist der Einfluß von Temperaturen, die über dem Wachstumsoptimum liegen. Auch diese beeinträchtigten bei den gewählten Temperaturgraden die Vermehrung in einer Bouillon nicht merklich. Bei 45° C aber trat im Milchsäure-Ammo-

niak-Nährboden innerhalb 8 Tagen kein Wachstum der Paratyphus B-Bazillen auf. Hierbei handelte es sich tatsächlich nur um eine Entwicklungshemmung; denn nach 8 Tagen waren die wenigen eingesäten Bakterien (3 Oesen einer gut gewachsenen flüssigen Kultur) noch lebend; eine Bebrütung bei 37° ergab am 9. Tage innerhalb 18 Stunden üppige Vermehrung dieser Keime bis zur milchigen Trübung derselben bisher klar gebliebenen Kulturflüssigkeit. Außerdem erwies sich eine gewachsene 24-stündige Milchsäure-Ammoniakkultur, die gleichzeitig bei 45° gehalten wurde, noch nach 8 Tagen als lebend. Es handelte sich also wie bei der Entwicklungshemmung durch chemische Desinfektionsmittel nur darum, daß im Gegensatz zum Leben in der Bouillon im einfachen künstlichen Nährboden eine Vermehrung der Keime nicht mehr möglich war. Auch hierfür sind die im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden fehlenden chemischen Elemente nicht verantwortlich zu machen; das geht daraus hervor, daß der Zusatz von Schwefel, Magnesium, Kalzium und Eisen in Form von Magnesiumsulfat, Kalziumchlorid und Eisensulfat in Mengen, wie sie in Tabelle IV angegeben sind, an dieser Erscheinung nichts ändern.

Auch bei 48° wuchsen die Paratyphus B-Bazillen in der Nährbouillon innerhalb 20 Stunden bis zur üblichen Trübung des Nährbodens heran. Im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden trat kein Wachstum auf, doch waren bei dieser Temperatur die in den einfachen Nährboden eingesäten Keime nach 4 Tagen nicht mehr am Leben. Hier also hat die erhöhte Temperatur allmählich zur Abtötung geführt, während dabei in Bouillon noch üppiges Wachstum stattfindet. Eine gut gewachsene 3 Tage alte Milchsäure-Ammoniakkultur, die gleichzeitig bei 48° gehalten wurde, ist zwar nicht abgetötet worden, doch war der Verlust an lebenden Keimen innerhalb desselben Zeitraumes viel stärker als bei 37°.

Dieser Versuch führt also bereits zu den vergleichenden Abtötungsversuchen durch Hitze hinüber. Hierbei läßt sich wieder der chemisch-physikalische Einfluß des Nährbodens als Suspensionsmittel dadurch ausschalten, daß man die in verschiedenen Nährböden aufgewachsenen Keime in Kochsalzlösung als gleichartiges, indifferentes Medium überträgt.

Ficker[1]) hat in seinen Untersuchungen über das Absterben pathogener Keime gezeigt, daß Choleravibrionen von höheren Temperaturen in Bouillon weit langsamer abgetötet werden, als in Kochsalzlösung; vermutlich spielt hier also das Aufschwemmungsmittel eine physikalische Rolle. Wie aus der unten stehenden Tabelle V hervorgeht, trifft diese Beobachtung für die viel widerstandsfähigeren Paratyphus B-Bazillen nicht zu. Die große Bedeutung der Keimzahl, welche aus Fickers Untersuchungen so deutlich hervorgeht, fordert bei vergleichenden Versuchen sorgsame Beachtung einer gleichgroßen Zahl lebend eingesäter Bakterien.

Tabelle V gibt 2 Beispiele von Abtötung durch verschiedene Temperaturen in gleichartigem und differentem Suspensionsmittel. Die Versuchsanordnung geht aus der Tabelle hervor.

Tabelle V.

Versuch 44 und 59 (25. II. und 17. IV. 20): Abtötung verschieden ernährter Paratyphus B-Bazillen durch Hitze im gleichen und in verschiedenen Medien.

Zeit nach der Einsaat	Abtötungstemperatur 50° C				Abtötungstemperatur 55° C	
	10 Tropfen Bouillonkultur in		10 Tropfen Milchs.-Ammoniakkultur in			
	5 ccm Bouillon	5 ccm 0,85-proz. NaCl-Lösung mit 10 Tropfen Milchs.-Ammoniak-Nährboden	5 ccm 0,85-proz. NaCl-Lösung mit 10 Tropfen Bouillon	5 ccm Milchs.-Ammoniak-Nährboden	10 Tropfen Bouillonkultur in 5 ccm 0,85-proz. NaCl-Lösung mit 10 Tropf. Milchs.-Ammon.-Nährboden	10 Tropf. Milchs.-Ammon.-Kultur in 5 ccm 0,85-proz. NaCl-Lösung mit 10 Tropfen Bouillon
5 Min	+	+	+	+	+	+
10 „	+	+	+	+	+	+
20 „	+	+	+	+	+	—
30 „	+	+	eine Kolonie	—	+	—
45 „	+	+	—	—	+	—
1 Std.	+	+	—	—	+	—
1½ „	+	+	—	—	—	—
2 „	+	+	—	—	—	—
3 „	+	+	—	—	—	—

Ergebnis: Unabhängig vom Suspensionsmittel wird die Bouillonkultur langsamer abgetötet, als die Milchsäure-Ammoniakkultur.

1) Ficker, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., Bd. 29, 1898, p. 1.

Es zeigt sich also unabhängig von der umspülenden Flüssigkeit ein sehr markanter Unterschied in der Widerstandskraft der verschieden ernährten Bakterien. Bei 50° wurden die in Bouillon aufgewachsenen und in physiologische Kochsalzlösung eingebrachten Keime in 3 Stunden überhaupt noch nicht abgetötet, die dem Milchsäure-Ammoniak-Nährboden entstammenden und ebenfalls in Kochsalzlösung übertragenen Bazillen dagegen in einer halben bis einer Stunde. Bei 55° sind die Milchsäure-Ammoniak-Bakterien in $\frac{1}{4}$ oder $\frac{1}{5}$ der Zeit abgetötet als die Bouillon-Bakterien. Geht man mit der Temperatur noch höher hinauf bis auf 60°, so verwischt sich der Unterschied, weil beide Kulturen rasch abgetötet werden.

Analoge Versuche mit Gärtner-Bazillen, auf deren Wiedergabe verzichtet werden kann, ergaben genau das gleiche Resultat, so daß diese Beobachtung also weder eine Eigenart des Stammes noch der Rasse ist.

Als Erklärung für diese Erscheinung kann der verschiedene Ablauf der Stoffwechselprozesse nicht herangezogen werden. Denn der Aufbau aus den verschiedenartigen Bausteinen ist durch die Uebertragung in Kochsalzlösung unterbrochen. Gerade wie bei den Abtötungsversuchen mit chemischen Körpern, muß man auch hier aus der verschiedenen Widerstandsfähigkeit gegen physikalische Schädigungen den Schluß ziehen, daß die unter differenten Ernährungsbedingungen aufgewachsenen Bakterien selber verschieden sind. Wiederum spricht diese Tatsache für eine Veränderung der inneren Struktur der Keime. Wiederum denken wir dabei an die längere und dünnere Gestalt der Bakterien im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden, hier wohl weniger an die Oberflächenvergrößerung, als an den sichtbaren Ausdruck anderer Verteilung von Ekto- und Endoplasma.

III. Ueber die Ausflockung verschieden ernährter Bakterien durch Säure.

Die Säureagglutination der Bakterien ist von der spezifischen Serumagglutination scharf zu trennen. Bei letzterer unterscheiden wir ja den Prozeß der Agglutininbindung und der Ausflockung. Nur in diesem zweiten, chemisch-physikali-

schen Vorgang gleichen sich die unspezifische, keimtötende Ausflockung durch Säure, Sublimat, Formalin usw. und die spezifische, die Bakterien nicht schädigende Serumagglutination. Bei der Säureausflockung sind also die Keime ebenso wie bei den vorher besprochenen chemischen und physikalischen Einflüssen einer Schädigung ausgesetzt; auf diese reagieren nach Michaelis[1]) und Beniasch[2]) die Bakterienarten häufig verschieden; die Ausflockung kommt im allgemeinen nur innerhalb bestimmter minimaler und maximaler Konzentrationen freier Wasserstoffionen zur Ausbildung und erreicht ihr Optimum bei einem Säuregrad, der für Stämme einzelner Arten einen konstanten, von anderen verschiedenen Wert darstellt.

Für unsere Fragestellung ist die vergleichende Säureagglutination verschieden ernährter Bakterien aus folgenden Gründen von Interesse. Die weitgehende Analogie zwischen der Bakterienausflockung und der Kolloidfällung [Bordet[3]), M. Neisser und Friedemann[4])] führte zu der Annahme, daß die durch Säure agglutinable Substanz im Bakterium ein Eiweißkörper ist, welcher zu derjenigen Gruppe von Kolloiden gehört, die in ihrem isoelektrischen Punkt ausflocken (Michaelis). Daß die Bakterienarten verschieden oder gar nicht auf den Zusatz freier Wasserstoffionen reagieren, kann seine Ursache entweder darin haben, daß sie verschiedene Mengen oder Arten eines solchen Kolloids enthalten, oder aber, daß andere Stoffe, Schutzkörper, die Fällung hintanhalten. Jedenfalls und deshalb waren diese Verhältnisse zu erwähnen, weist der verschiedene Ausfall der Säureagglutination unter sonst gleichen Versuchsbedingungen auf eine differente Zusammensetzung der Bakterienleiber hin. Es lag also nahe, die aus so ungleichartigen Nährstoffen sich aufbauenden Paratyphus B-Bazillen auch gegenüber dieser chemisch-physikalischen Schädigung zu vergleichen.

1) L. Michaelis, Dtsch. med. Wochenschr., 1911, p. 969; Abderhaldens Handbuch der biochemischen Arbeitsmethode, Bd. 3.

2) Beniasch, Zeitschr. f. Immunitätsf., Orig., Bd. 12, 1912, p. 268.

3) Bordet, Annales Pasteur, 1896.

4) M. Neisser und Friedemann, Münch. med. Wochenschr., 1904, No. 11.

Die Versuchsanordnung schließt sich der von Beniasch ausführlich angegebenen an. Durch Mischung größerer und kleinerer Quanten milchsauren Natrons und Milchsäure werden ansteigende Konzentrationen freier Wasserstoffionen erzielt. Die Emulsionen der aus verschiedenen Nährböden stammenden Keime müssen, um vergleichbare Resultate zu bekommen, möglichst frei von Nährbodenbestandteilen, insbesondere von Salzen sein. Wie eingangs dieser Ausführungen bemerkt, entspricht nur der flüssige Milchsäure-Ammoniak-Nährboden den an ihn gestellten Anforderungen chemischer Reinheit; wir haben also zunächst die Bakterien aus dem flüssigen Milchsäure-Ammoniak-Nährboden und aus Bouillon abzentrifugiert, den Bodensatz mit destilliertem Wasser gewaschen und wiederum in destilliertem Wasser suspendiert. Der einfachere Weg der Abschwemmung von agarhaltigen, festen Nährböden führte zu den gleichen Versuchsergebnissen, sogar das Waschen der Keime erwies sich als überflüssig, sofern nur das Kondenswasser aus den Schrägagarröhrchen vor der Abschwemmung entfernt und sein Rest mit destilliertem Wasser fortgespült wurde. Die Wiederholungen der Versuche sind also mit dieser einfacheren Methodik angestellt worden, und dies um so lieber, als man dadurch dem Einwand entging, durch das Waschen mit destilliertem Wasser irgendwelche Substanzen aus den Bakterienleibern extrahiert zu haben. Die Schrägnähragarröhrchen wurden mit je 4 ccm Flüssigkeit abgeschwemmt. Auf gleiche Dichte der Bakterienaufschwemmungen, welche ja aus den verschieden ernährten Keimen bestanden, wurde sorgfältig geachtet. Die Kulturen waren jeweils 24 oder 48 Stunden alt. Da die Säureagglutination der vom Nähragar stammenden Typhusbazillen am konstantesten das typische Phänomen ergibt, haben wir uns durch gleichzeitiges Ansetzen einer Reihe ansteigender Wasserstoffionenkonzentrationen mit Typhusbazillen von der Richtigkeit des Salzsäuregemisches überzeugt. Die Einzelheiten der Versuchsanordnung finden sich ausführlich bei Beniasch, im übrigen gehen sie aus den Versuchsbeispielen in Tabelle VI hervor, welche je eine Säureausflockung von Paratyphus B und Gärtner-Bazillen, die jeweils unter differenten Ernährungsbedingungen aufgewachsen sind, wiedergibt.

Tabelle VI.

Versuch 51 und 57 (8. IV. und 20. IV): Säureagglutination verschieden ernährter Paratyphus B- und Gärtner-Bazillen.

Röhrchen	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Wasserstoffionenkonzentration	$1{,}7 \cdot 10^{-5}$	$3{,}5 \cdot 10^{-5}$	$0{,}7 \cdot 10^{-4}$	$1{,}4 \cdot 10^{-4}$	$2{,}8 \cdot 10^{-4}$	$5{,}5 \cdot 10^{-4}$	$1{,}1 \cdot 10^{-3}$	$2{,}2 \cdot 10^{-3}$	$4{,}4 \cdot 10^{-3}$
Milchsaures Natron $^1/_{10}$-n	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Milchsäure (von 1—5 = $^1/_{10}$-n; von 6–9 = $^1/_1$-n)	0,06	0,12	0,25	0,5	1.0	0,2	0,4	0,8	1,6
Destilliertes Wasser	1,54	1,48	1,36	1,1	0,6	1 4	1,2	0.8	0
Kultur	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Paratyphus B-Bazillen									
aufgewachsen auf Bouillon-Agar	—	—	(+)	+	++	(++)	(+)	(+)	(±)
aufgewachsen auf Milchsäure-Ammoniak-Agar	—	(+)	(++)	+	++	+++	+++	+++	+++
Gärtnerbazillen									
aufgewachsen auf Bouillon-Agar	—	(+)	(+)	(++)	+	+	+	++	+
aufgewachsen auf Milchsäure-Ammoniak-Agar	(±)	+	++	++	++	++	++	+++	+++

Zeichenerklärung: +++ vollkommene Ausflockung; ++ starke Ausflockung; + deutliche Ausflockung; (++) nur mit Lupenvergrößerung sichtbare kräftige Ausflockung; (+) nur mit Lupenvergrößerung sichtbare schwache Ausflockung; (±) nur mit Lupenvergrößerung sichtbare Spuren von Ausflockung.

Ergebnis: Die Milchsäure-Ammoniakkulturen werden stärker ausgeflockt, ihr Agglutinationsmaximum liegt nicht bei derselben H-Ionenkonzentration wie das der Bouillonkultur.

In diesen Versuchen zeigt sich zunächst ein Unterschied zwischen den Bouillonkulturen der benützten Paratyphus B- und Gärtner-Stämme, ähnlich wie ihn Beniasch beschrieben hat. Das Optimum der Ausflockung liegt bei verschiedenen Säurekonzentrationen. Die aus einfachen chemischen Körpern aufgebauten Keime unterscheiden sich nun bei beiden Bakterienrassen sehr deutlich von den Bouillonstämmen; die Ausflockung ist viel stärker und steigt mit zunehmendem Gehalt an freien Wasserstoffionen innerhalb der angesetzten Reihen fortschreitend an. In diesen Versuchen zeigt dabei der aus dem Milchsäure-Ammoniak-Nährboden stammende Paratyphus B-Bazillus ein dem Gärtner-Bazillus recht ähnliches Verhalten, jedenfalls ähnlicher als es bei den Bouillonstämmen der beiden Bakterienrassen in die Erscheinung tritt.

Es ergibt sich also auch hier ein prägnanter Unterschied im Verhalten der verschieden ernährten Kulturen gleicher Stämme. Wir finden also wiederum bestätigt, daß die stoffliche Zusammensetzung der beiderlei Bakterien ungleichartig ist. Das für die einzelnen Arten von Michaelis und Beniasch beschriebene Optimum der Ausflockung bei ganz bestimmten Wasserstoffionenkonzentrationen wechselt also je nach dem Stoffwechsel, welcher zum Aufbau der Bakterienleiber geführt hat. Als eine der möglichen Erklärungen kommt wiederum die Oberflächendifferenz der Keime, wie sie sie in Bouillon und im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden aufweisen, in Betracht. Die größere Oberfläche und relativ geringere Masse mag eine Steigerung der Empfindlichkeit gegen Säureionen verständlich machen. Der im Verhältnis zur Oberfläche geringere Gehalt an Proteinen kann insofern zu denken geben, als ja nach Neisser und Friedemann[1]), Porges[2]) gerade Bakterienproteine einen die Fällung hemmenden Einfluß ausüben und als Schutzkörper wirken sollen. Das veränderte Verhalten der aus einfachen Körpern aufgebauten Keime erinnert an den Unterschied in der Säureausflockung gekochter und ungekochter Bouillonbakterien, wobei die gekochten Keime viel stärker und bei den verschiedenen untersuchten Arten gleichmäßig ausgefällt werden (Beniasch). Das eine Mal würde sich diese Erscheinung durch Zerstörung von Bakterienproteinen, das andere Mal durch geringeren Gehalt an diesen Eiweißkörpern erklären lassen.

Zusammenfassung.

Wir überblicken die mitgeteilten Versuche. Sie ergeben übereinstimmend, daß sich mit den Ernährungsbedingungen, die zu verschiedenartigem Ablauf des Stoffwechsels Veranlassung geben, bestimmte biologische Eigenschaften der Bakterien ändern, so daß man zur Annahme einer unterschiedlichen Konstitution der Keime geführt wird. Bakterien, die sich aus wenigen einfachen Stoffen entwickelt haben, waren gegen Einwirkungen chemischer, physikalischer und physikalisch-

1) M. Neisser und Friedemann, l. c.

2) Porges, Centralbl. f. Bakt., Bd. 40, 1906.

chemischer Art empfindlicher als Keime, die zahlreiche, unter geringerem Energieaufwand zu assimilierende Nährstoffe zur Verfügung hatten. Die eine leichtere und ausgiebigere Nahrungsaufnahme gestattende Oberflächenvergrößerung der im einfachen künstlichen Nährboden aufgewachsenen Keime mag zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegen diese schädigenden äußeren Einflüsse beitragen. Jedenfalls ist die Verschiebung des Verhältnisses von Masse zur Oberfläche ein Ausdruck für eine differente stoffliche Zusammensetzung verschieden ernährter Bakterien.

Zweiter Teil.

E. Veränderte serologische Eigenschaften verschieden ernährter Bakterien.

I. Unterschiedliches agglutinatorisches Verhalten.

Haben wir aus den bisherigen Versuchen ein verschiedenartiges biologisches Verhalten unterschiedlich ernährter Keime desselben Stammes kennen gelernt und die Möglichkeit erörtert, daß dieses auf differenter stoftlicher Zusammensetzung des Bakterienkörpers beruhen könnte, so ist es jetzt unsere Aufgabe, diese Frage zu klären und diese Abweichungen näher zu untersuchen. Es handelt sich darum, wie weit diese durch verschiedenartigen Ablauf des Stoffwechsels bedingte Verschiedenheit der Eigenschaften geht. Dazu soll eine vergleichende Untersuchung des antigenen Apparates der in Bouillon und im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden aufgewachsenen Keime dienen. Es wurden dazu Paratyphus B- und Gärtnerbazillen gewählt, Bakterien, deren Unterscheidung bis jetzt nicht auf kulturellem Wege durch Stoffwechselbesonderheiten, sondern nur durch serologische Eigenschaften möglich ist. Sind die verschieden ernährten Bakterien wirklich in ihrem Aufbau verschieden, so ist zu erwarten, daß dies in ihren serologischen Besonderheiten, die wir ja als den feinsten Ausdruck ihrer stofflichen Zusammensetzung anzusehen haben, zum Ausdruck kommt.

Eine für unsere Fragestellung wichtige Tatsache, die früher bereits von Braun und Cahn-Bronner mitgeteilt worden ist, sei den kommenden Versuchen vorweg genommen. Züchtet man Paratyphus B- und Gärtner-Bazillen im Milch-

säure-Ammoniak-Nährboden, so daß beide gezwungen sind, sich aus denselben 4 Bausteinen: Kochsalz, Kaliumbiphosphat, Ammonium und Milchsäure aufzubauen, so bilden sie dabei alle die ihrer Rasse charakteristischen antigenen Eigenschaften aus. Von Gärtner-Immunserum werden Paratyphus B-Bazillen geringer als Gärtnerbazillen, und umgekehrt von Paratyphus B-Immunserum die Paratyphus B-Bazillen höher als Gärtner-Bazillen agglutiniert, und von Typhus-Immunserum werden die Gärtner-Bazillen weit höher agglutiniert, als die Paratyphus B-Bazillen, ganz einerlei, ob die Keime aus Bouillon oder dem Milchsäure-Ammoniak-Nährboden stammen. Es geht daraus bereits die für unsere Fragestellung wichtige Tatsache hervor, daß die biologische Differenz zwischen den verschieden ernährten Bakterien die Grenzen der einzelnen Rassen gegeneinander nicht überschreitet und die Konstanz der Art resp. Rasse auch beim Aufbau aus den 4 gleichen einfachen Bausteinen gewahrt bleibt.

Es soll nun der antigene Apparat der Bouillon- und Milchsäure-Ammoniak-Kulturen desselben Bakterienstammes untersucht werden.

Agglutination durch homologes Immunserum.

Die Agglutination verschiedener Bakterien kann sich in dreifacher Beziehung unterscheiden: Erstens im Titer oder der Extensität der Agglutination, d. h. in dem Grad der Serumverdünnung, bei welcher die Keime noch zur Ausflockung gebracht werden; zweitens in der Intensität der Agglutination, d. h. in der Art und Größe der Flocken, welche dick, schneeflockenartig, mit unbewaffnetem Auge bequem sichtbar oder klein, körnig und nur mit Lupenvergrößerung erkennbar sein können [Weil und Felix[1] [2]] und drittens in der Zeit, die zur Ausflockung nötig ist. Auf alle drei Punkte soll geachtet werden.

Tabelle VII gibt drei Beispiele, die aus einer größeren Zahl von Versuchen so ausgewählt sind, daß sie das Wesentliche aller Versuchsreihen zeigen.

---

1) Weil und Felix, Zeitschr. f. Immunitätsf., Orig., Bd. 29, 1920, p. 24.

2) Weil, Felix und Mitzenmacher, Wiener klin. Wochenschr., Bd. 46, 1918, p. 1226.

Tabelle VII.

Agglutination durch homologes Serum.

Agglutination verschieden ernährter Paratyphus B-Bazillen durch 3 Paratyphus B-Immunsera (von Kaninchen).

Vers.-No.	Serum	Nährboden, in dem die Keime aufgewachsen sind	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1600	1 : 3200	1 : 6400	Kontr.
		nach 1 Stunde										
41	Paratyphus B-Immun-Serum 27 (Kaninchen)	Bouillon	++	+	+	±	(+)	—	—	—	—	—
		Milchsäure-Ammoniak-Nährboden	±	(++)	(±)	—	—	—	—	—	—	—
		nach 4 Stunden										
		Bouillon	++	++	++	+	(±)	?	—	—	—	—
		Milchsäure-Ammoniak-Nährboden	+	(++)	(+)	(±)	(±)	—	—	—	—	—
		nach 24 Stunden										
		Bouillon	++	+++	++	+	+	±	—	—	—	—
		Milchsäure-Ammoniak-Nährboden	+	+	±	(++)	(±)	?	—	—	—	—
		nach 1 Stunde										
35	Paratyphus B-Immun-Serum 883 (Kaninchen)	Bouillon	++	++	+	+	(+)	(±)	—	—	—	—
		Milchsäure-Ammoniak-Nährboden	(±)	(+)	(+)	(+)	(±)	(±)	—	—	—	—
		nach 4 Stunden										
		Bouillon	+++	+++	++	++	(++)	(±)	—	—	—	—
		Milchsäure-Ammoniak-Nährboden	++	+	+	+	(++)	(±)	—	—	—	—
		nach 24 Stunden										
		Bouillon	+++	+++	+++	+++	(++)	(+)	—	—	—	—
		Milchsäure-Ammoniak-Nährboden	++	+++	++	++	(++)	(+)	—	—	—	—
		nach 1 Stunde										
37	Paratyphus B-Immun-Serum 770 (Kaninchen)	Bouillon	+++	+++	+++	+	+	(++)	(±)	—	—	—
		Milchsäure-Ammoniak-Nährboden	+	+	+	+	(++)	(±)	—	—	—	—
		nach 4 Stunden										
		Bouillon	+++	+++	+++	+++	++	+	(++)	(±)	(±)	—
		Milchsäure-Ammoniak-Nährboden	++	++	++	+	(++)	(+)	—	—	—	—
		nach 24 Stunden										
		Bouillon	+++	+++	+++	+++	++	+	+	(±)	(±)	—
		Milchsäure-Ammoniak-Nährboden	+++	+++	+++	+++	++	(++)	(±)	(±)	(±)	—

Zeichenerklärung:

+++ vollkommene grobflockige Agglutination
++ starke mittelflockige "
+ deutliche feinflockige "
± schwache feinflockige "
} Flocken makroskopisch sichtbar

(++) starke feinflockige Agglutination
(+) deutlich feinflockige "
(±) angedeut. feinflock. "
} Flöckchen nur bei Lupenvergrößerung sichtbar

In den ersten Versuchen wurden die Bakterien im flüssigen Nährboden gezüchtet, da man sich aus oben wiederholt bezeichneten Gründen vor agarhaltigen Nährböden scheute. Doch zeigte sich auch bezüglich der Agglutination kein Unterschied zwischen Kulturen von flüssigen und festen, einen möglichst sauberen Agar enthaltenden Nährböden, so daß für die meisten Versuche der viel bequemere Weg des Abschwemmens aus den sogenannten Kolle-Schalen, die mit Nähragar oder festem Milchsäure-Ammoniak-Nährboden beschickt waren, gewählt werden durfte. Auf gleichdichte Bakterienemulsionen wurde peinlichst geachtet. Die Röhrchen standen 1 Stunde bei 37°, dann bei Zimmertemperatur und wurden nach 1, 4 und 24 Stunden abgelesen.

Im ersten Beispiel, Versuchsnummer 41, wurde ein Kaninchenimmunserum verwendet, das durch subkutane und intravenöse Injektionen einer mit Aether abgetöteten Nähragarkultur des gleichen Paratyphus B-Stammes gewonnen war, mit welchem diese Agglutinationsversuche ausgeführt wurden. Man sieht, wie die dem Milchsäure-Ammoniak-Nährboden entstammenden Keime deutlich schwächer agglutiniert werden als die Bouillon-Bakterien. Dieser Unterschied kann sich in allen drei oben genannten Punkten ausprägen. Die drei Beispiele sind so gewählt, daß Versuch 41 eine besonders deutliche Differenz, wie man sie mit homologem Immunserum nur gelegentlich erhält, Versuch 37 eine schwächere Differenz, so wie sie die Regel ist, und Versuch 35 nur noch eine Andeutung dieses Unterschiedes zeigt, was auch gelegentlich vorkommt.

Im ersten Beispiel drückt sich die schwächere Agglutination sowohl im zeitlichen Verlauf, wie besonders in der Art und Stärke der Ausflockung, dann aber auch, was nicht bei jedem Serum beobachtbar ist, im Titer aus. Während die Bouillonkultur in den stärksten Serumkonzentrationen in dicken, weichen Flocken unter völliger Klärung der Flüssigkeit zu Boden gesunken ist, blieb die Aufschwemmung der Milchsäure-Ammoniakkultur trüb, zeigte aber eine deutliche, auch mit unbewaffnetem Auge erkennbare, feinkörnige Flockung; in schwächeren Serumverdünnungen war die Bouillonkultur makroskopisch agglutiniert, die Flocken der Milchsäure-Ammoniakkultur nur mit der Lupe sichtbar. In Versuch 37 ist das Phänomen nach 1 Stunde sehr deutlich, nach 4 Stunden ist eine ausgesprochene Titerdifferenz zu-

stande gekommen; nach 24 Stunden aber hat ein gewisser Ausgleich stattgefunden, so daß die Erscheinung nur noch angedeutet ist. Und in noch geringerem Grade tritt das Phänomen in Versuch 35 auf, wo es nach 24 Stunden so gut wie nicht mehr zu sehen ist.

Diese Beobachtung ist in den eben besprochenen Grenzen immer reproduzierbar. Macht man die Bakterienaufschwemmung zu dünn, so wird sie naturgemäß undeutlich, da man ja die Stärke einer Agglutination durch Zugabe von mehr oder weniger Bakterien bis zu einem gewissen Grade in der Hand hat; deshalb ist es besonders wichtig, bei vergleichenden Untersuchungen auf gleichtrübe Bakterienemulsionen zu achten.

Die Versuche sind mit der 60.—80. Passage von Paratyphus B-Bazillen im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden angestellt und zogen sich über 3 Monate hin; innerhalb dieser Zeit war kein Unterschied im Verhalten der verschiedenen Passagen zu beobachten, welcher etwa auf eine Anpassung an den Milchsäure-Ammoniak-Nährboden im Sinne eines Verschwindens der Differenz zwischen Bouillon- und Milchsäure-Ammoniak-Bakterien schließen ließe.

Die Ursache der geringeren Agglutination der Milchsäure-Ammoniak-Bakterien ist, wie aus den mitgeteilten Versuchen hervorgeht, in den Bakterien zu suchen. Trotzdem fallen die Versuche mit verschiedenen Immunsera nicht ganz gleich aus; das beschriebene Phänomen ist einmal deutlicher, einmal weniger ausgesprochen. Dafür ist nicht etwa die Tierart, von der das Serum stammt, verantwortlich zu machen. Die drei obigen Beispiele in Tabelle VII beziehen sich sämtlich auf Kaninchensera und weisen trotzdem eine verschieden starke Ausbildung des Phänomens auf. Sera anderer Tiere, z. B. vom Esel oder Pferd, geben dieselben Resultate. Eine Wiedergabe dieser ganz gleichsinnigen Versuche ist deshalb unnötig. Da wir aus den Arbeiten von Weil und Felix[1]), Braun und Salomon[2]), Braun und Schäffer[3]), Sachs und Schloß-

1) Weil und Felix, l. c.

2) Braun und Salomon, Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 81, H. 1/2; B. 82, H. 3/4.

3) Braun und Schäffer, Berlin. klin. Wochenschr., 1918, No. 18; Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 89.

berger[1]), Braun[2]), Feiler[3]) wissen, daß das Bakterien-agglutinogen kein einheitlicher Stoff ist, und wir deshalb auch mit verschiedenen Agglutininen als Reaktionsprodukten des Körpers auf die einzelnen Antigene rechnen müssen, so wird diese Verschiedenheit der Sera, mit der sie das Phänomen der geringeren Agglutination der Milchsäure-Ammoniak-Bakterien zur Ausbildung bringen, mit dem individuell wechselnden Gehalt an den einzelnen Agglutininen zu erklären sein.

Ein anderes Bakterium zeigte ganz dieselbe Erscheinung wie die Paratyphus B-Bazillen. Von Gärtner-Bazillen wurden durch Gärtner-Immunserum die im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden aufgewachsenen Keime schwächer und langsamer ausgeflockt als die Bouillonkulturen. Auch hier kann von der Wiedergabe der Versuche Abstand genommen werden.

Ist man nun zu dem Schlusse berechtigt, die verminderte Agglutinabilität dieser mühsam nur aus den notwendigsten Nährstoffen entwickelten Keime auf eine Verschiedenheit ihrer Rezeptoren, also ihres inneren Aufbaues, zu beziehen. Jedenfalls hat man zuvor noch andere Erklärungsmöglichkeiten zu erwägen:

Wir haben ja bei der Agglutination den spezifischen Vorgang der Agglutininbindung und den chemisch-physikalischen Prozeß der Ausflockung zu unterscheiden. Könnte der verschiedene Ausfall der Agglutination nicht auf einer durch irgendwelche physikalische Verhältnisse bedingten Verringerung der Ausflockbarkeit der Milchsäure-Ammoniak-Bakterien beruhen?

Dagegen sprechen drei Gründe: Zunächst der fast immer gleich hohe Titer der beiden Kulturen bei der Agglutination mit homologem Serum. Dann zweitens eine Beobachtung, die gelegentlich zu machen ist; in seltenen Fällen stellt sich der Titer der Milchsäure-Ammoniak-Kultur vorübergehend höher ein als bei der Bouillonkultur, doch ist nach 24 Stunden regelmäßig die Bouillonkultur gleich hoch oder höher agglutiniert.

---

1) Sachs und Schloßberger, Arb. a. d. Inst. f. exp. Ther. u. d. Georg Speyer-Haus, 1919, H. 6.

2) Braun, Zeitschr. f. allg. Physiologie, Bd. 19, 1920, H. 1.

3) Feiler, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 29, 1920, p. 303.

(Auf diese Beobachtung wird weiter unten nochmals eingegangen.) Dies spricht natürlich gegen eine verringerte Ausflockbarkeit. Und schließlich wurde eine im Gegenteil verstärkte Ausflockbarkeit der Milchsäure-Ammoniak-Bakterien ja bereits bei der Säureagglutination beobachtet. Ganz allgemein flocken diese in Kochsalzlösungen verschiedener Konzentrationen leichter aus als die Bouillonbakterien, und die Spontanagglutination ist eine in flüssigen Milchsäure-Ammoniak-Kulturen und Abschwemmungen vom agarhaltigen einfachen Nährboden sehr häufige Beobachtung; dadurch sind sogar diese Versuche öfters erheblich gestört und erschwert worden. Dabei war wiederholt festzustellen, daß sich trotz einer deutlichen, mit der Lupe sichtbaren Spontanagglutination der Milchsäure-Ammoniak-Kultur trotzdem das Phänomen ihrer geringeren Agglutination in starken Serumkonzentrationen ebenso deutlich ausgeprägte, als wenn die Kontrolle einwandfrei war. Gerade diese Beobachtung widerlegt den Einwand einer verminderten Ausflockbarkeit am vollkommsten.

Ein weiterer Einwand wäre noch im Aufschwemmungsmittel, in welchem die Keime agglutiniert werden, zu suchen. Denn es ist nicht zu leugnen, daß auch beim Abschwemmen von agarhaltigen Nährböden Nahrungsbestandteile gelöst und mit den Keimen in die Versuchsröhrchen übertragen werden, wenn man nicht, so wie dies z. B. bei der Säureagglutination nötig war, besondere Vorsichtsmaßregeln dagegen ergreift. Und wir wissen, daß die Ausflockung der Bakterien in hohem Grade von dem Salzgehalt des Aufschwemmungsmittels abhängig ist. Um uns von dem Einfluß der verwendeten Nährbodenbestandteile auf die Ausflockung zu überzeugen, wurde ein extremer Fall dadurch geschaffen, daß die Serumverdünnungen einmal mit Bouillon, das andere Mal mit dem Salzgemisch des Milchsäure-Ammoniak-Nährbodens hergestellt wurden und dann der mit physiologischer Kochsalzlösung vom Nähragar abgeschwemmte Bouillonstamm zugesetzt wurde. Die Agglutination fiel in beiden Medien bezüglich Titerhöhe, Art der Flockung und Schnelligkeit vollkommen gleich aus; es war auch nicht eine Andeutung des Phänomens zu beobachten, wie es der Vergleich zwischen Bouillon und Milchsäure-Ammoniak-Bakterien aufweist. Dadurch ist also auch

die Rolle des Aufschwemmungsmittels für diese Erscheinung als bedeutungslos erwiesen.

Nachdem wir also nicht nachweisen konnten, daß die geringere Agglutinierbarkeit der Milchsäure-Ammoniak-Kultur durch physikalische Faktoren bedingt ist, sind wir zu der Annahme berechtigt, in der spezifischen Phase, nämlich der Reaktion zwischen Agglutinogen und Agglutinin, die Ursache für diese Erscheinung zu suchen.

Es ist nun unsere Aufgabe, zu untersuchen, ob die Leiber der verschiedenartig ernährten Bakterien desselben Stammes eine unterschiedliche Zusammensetzung aufweisen und welcher Art diese Differenzen sind. Es sind dafür zwei Möglichkeiten gegeben: Qualitative Verschiedenheit der Bakterienleiber, welche entweder durch Entstehung neuer Agglutinogene oder vollständigen Verlust eines oder mehrerer vorher vorhandener zustande kommen könnte, oder zweitens eine quantitative Verschiebung der einzelnen Leibesbestandteile gegeneinander. Solche tiefgreifende Veränderungen eines Bakteriums durch Verluste sind bekannt. Nach den oben zitierten Arbeiten verlieren Proteus- und Typhusbazillen bei länger dauernder Unterernährung und Züchtung auf karbolhaltigen Nährboden einen Teil ihrer Agglutinogene vollständig. Bedenkt man, daß den Bakterien im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden einige chemische Elemente, die sonst allgemein als Protoplasmabestandteile gelten, ganz fehlen oder nur in Spuren zur Verfügung stehen, so wäre es gewiß denkbar, daß sie irgendwelche Stoffe in ihrem Leibe nicht aufbauen können, die sie in einer Bouillon zur Ausbildung bringen. Deshalb interessiert uns in diesem Zusammenhange die Frage, ob die Erscheinung der geringeren Agglutination der Milchsäure-Ammoniak-Bakterien aufgehoben wird, wenn diese in einem Nährboden gezüchtet werden, der reichliche Mengen von Schwefel, Magnesium, Kalzium und Eisen, im übrigen aber die gleiche Stickstoff- und Kohlenstoffquelle wie früher enthält. Deshalb wurden Paratyphus B-Bazillen in einem Nährboden, der aus 0,5 Proz. Kochsalz, 0,2 Proz. Kaliumbiphosphat, 0,1 Proz. Magnesiumsulfat, 0,025 Proz. Kalziumchlorid und Eisensulfat zusammengesetzt war, 20 Passagen weit gezüchtet, und dann diese Kultur mit

der üblichen Milchsäure-Ammoniak-Kultur und den Bouillonbakterien verglichen. Einerlei, ob die Keime aus dem einfachen oder dem mit den mineralischen Zusätzen versehenen Milchsäure-Ammoniak-Nährboden stammten, wurden sie schwächer agglutiniert als der Bouillonstamm. Die im einfachen Nährboden fehlenden chemischen Elemente sind also für das beschriebene Phänomen nicht verantworlich zu machen.

Zur Beantwortung der Frage, ob die verschieden ernährten Bakterien trotzdem qualitativ oder nur quantitativ verändert sind, wurden mit der Bouillonkultur und den im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden aufgewachsenen Keimen Immunsera hergestellt. Dabei ist es notwendig, abgetötete Kulturen einzuspritzen, da ja die lebenden Keime bei ihrer etwaigen Vermehrung im Tierkörper solche Agglutinogene, die sie im einfachen Nährgemisch vielleicht nicht zu bilden vermochten, wieder zur Ausbildung bringen könnten. 5 derartige Sera, von denen 2 mittels Milchsäure-Ammoniak-Kultur und 3 mittels Bouillonkultur gewonnen waren, unterschieden sich nicht voneinander. Der Bouillonstamm wurde von allen 5 Sera bis zur Titergrenze agglutiniert, und ebenso war bei der Milchsäure-Ammoniak-Kultur kein Unterschied zu bemerken. Von Erschöpfungsversuchen konnte man deshalb absehen. Das Phänomen der geringeren Agglutinabilität der aus wenigen Bausteinen ernährten Keime war mit beiden Arten von Sera ganz gleichmäßig zu beobachten.

In diesen Versuchen liegt die Antwort auf die oben gestellte Frage. Da die mit den verschieden ernährten Bakterien hergestellten Sera gleichartige Agglutinine besitzen, so muß daraus der Schluß gezogen werden, daß die Paratyphus B-Bazillen im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden weder neuartige Agglutinogene bilden, noch solche, die sie in Nährbouillon zur Ausbildung bringen, verlieren.

Zur weiteren Analyse der beobachteten Differenz war das Verhalten der verschieden ernährten Keime gegenüber heterologen Sera zu prüfen. Hierbei war nur das Phänomen noch sehr viel prägnanter. Während es bei homologem Serum meist nur bei besonderer Beachtung des zeitlichen Verlaufes und der Flockengröße konstatierbar war, so sprang es hier in die Augen.

Es wurden in Bouillon- und im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden aufgewachsene Paratyphus B-Bazillen mit Typhus-Immunserum von Kaninchen, Esel und Pferd, mit Gärtner-Imunserum vom Esel und mit Paratyphus A-Serum vom Esel agglutiniert. In gleicher Weise wurden verschieden ernährte Gärtner-Bazillen mit Paratyphus B-Immunsera vom Kaninchen (und zwar mit Sera, die mittels Bouillonkultur und mittels Milchsäure-Ammoniak-Bakterien gewonnen waren) und außerdem mit Typhussera von Esel und Pferd und Paratyphus A-Serum vom Esel geprüft.

Die Unterschiede zwischen den Bakterien mit verschieden ablaufendem Stoffwechsel äußern sich hier in demselben Sinne, wie oben mit homologem Serum beschrieben. Deshalb ist eine Wiedergabe aller Versuche unnötig. Tabelle VIII enthält zwei solcher Versuche als Beispiel.

Die markanteste Seite des Phänomens ist wiederum die verschiedene Größe der Flocken; diese wurde in sämtlichen Versuchen einmal mehr, einmal etwas weniger deutlich beobachtet. Es ist dieser Unterschied in der Intensität unabhängig davon, ob eine Schnelligkeits- oder Titerdifferenz zustande kommt, und wie hoch sich nach 24 Stunden der Titer einstellt. So kann, wie z. B. bei einer Agglutination verschieden ernährter Gärtner-Bazillen durch Paratyphus B-Immunserum vom Esel, die Bouillonkultur von der Verdünnung 1:25 bis 1:3200 grobflockig unter völliger Klärung der Flüssigkeit zu Boden sinken, während die Milchsäure-Ammoniak-Kulturen bei denselben Serumverdünnungen trüb bleiben und eine gerade mit der Lupe deutlich sichtbare feinkörnige Flockung zeigen. In anderen Fällen kommt es auch bei der Milchsäure-Ammoniak-Kultur zur völligen Klärung, doch können auch dabei die Flöckchen so fein sein, daß sie mit unbewaffnetem Auge nicht zu erkennen sind. Die zeitliche Differenz fehlte bei heterologem Serum bei 48 Versuchen nur 2mal. Fast immer kommt dieser Schnelligkeitsunterschied in einem Zurückbleiben des Titers der Milchsäure-Ammoniak-Bakterien zum Ausdruck; relativ selten, in 7 von 48 Versuchen, kommt es aber zu einer rascheren Ausflockung und zu einem vorübergehenden Ueberschießen des Titers über den des Bouillonstammes (s. Tabelle VIII). Diese letztere Erscheinung ist ausnahmslos vorübergehend gewesen, so daß nach 24 Stunden mindestens

Tabelle VIII.

Agglutination durch heterologes Serum.

Agglutination verschieden ernährter Paratyphus B- und verschieden ernährter Gärtner-Bazillen durch Typhus-Immunserum (vom Esel).

Bakterien	Nährboden, von dem die Keime stammen:	1 : 25	1 : 50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	Kontrolle
Paratyphus B-Bazillen						nach 1 Stunde					
	Bouillon	(+)	(+)	(+)	(±)	—	—	—	—	—	—
	Milchs.-Ammoniak-Nährboden	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Milchs.-Ammoniak-Nährb. mit $MgSO_4$, $CaCl_2$ und $FeSO_4$	(±)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
						nach 4 Stunden					
	Bouillon	(++)	(+)	(+)	(±)	(±)	—	—	—	—	—
	Milchs.-Ammoniak-Nährboden	(±)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Milchs.-Ammoniak-Nährb. m. $MgSO_4$, $CaCl_2$ und $FeSO_4$	(±)	(±)	—	—	—	—	—	—	—	—
						nach 24 Stunden					
	Bouillon	+	(++)	(+)	(+)	(±)	(±)	(±)	—	—	—
	Milchs.-Ammoniak-Nährboden	+	(+)	—	—	—	—	—	—	—	—
	Milchs.-Ammoniak-Nährb. m. $MgSO_4$, $CaCl_2$ und $FeSO_4$	(±)	(+)	—	—	—	—	—	—	—	—
Gärtner-Bazillen						nach 1 Stunde					
	Bouillon	++	+	(++)	(++)	(+)	—	—	—	—	—
	Milchs.-Ammoniak-Nährboden	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	—	—	—	—	—
	Milchs.-Ammoniak-Nährb. m. $MgSO_4$, $CaCl_2$ und $FeSO_4$	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	—	—	—	—
						nach 4 Stunden					
	Bouillon	++	++	++	++	(+)	—	—	—	—	—
	Milchs.-Ammoniak-Nährboden	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	—	—	—	—	—
	Milchs.-Ammoniak-Nährb. m. $MgSO_4$, $CaCl_2$ und $FeSO_4$	(+)	(+)	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	—	—	—
						nach 24 Stunden					
	Bouillon	+++	+++	+++	+	(++)	(++)	(+)	(±)	—	—
	Milchs.-Ammoniak-Nährboden	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(±)	(±)	(±)	—	—
	Milchs.-Ammoniak-Nährb. m. $MgSO_4$, $CaCl_2$ und $FeSO_4$	(+)	(+)	(+)	(+)	(±)	(±)	(±)	(±)	—	—

Zeichenerklärung: s. Tabelle VII.

Titergleichheit oder sogar höhere Agglutination des Bouillonstammes bestand. Das Zurückbleiben hingegen des Titers der Milchsäure-Ammoniak-Bakterien gleicht sich keineswegs jedesmal aus; im Gegenteil ist die bei homologem Serum relativ seltene Differenz in der Extensität der Ausflockung bei heterologem Serum sehr häufig und kann, wie Beispiel I der Tabelle VIII zeigt, sehr erheblich sein. Die Ausprägung des gesamten Phänomens hängt von der Bakterienart und der Art des Serums ab. So sehen wir in unseren beiden Beispielen — und deshalb sind diese so ausgewählt worden — daß die Erscheinung bei der Agglutination von Paratyphus B-Bakterien durch Typhusserum deutlicher ist als bei der Ausflockung von Gärtner-Bazillen durch Typhusserum. Dies ist mit der Zahl der gemeinsamen Agglutinogene in Zusammenhang zu bringen, die ja bei Gärtner- und Typhusbazillen viel größer ist als bei Paratyphus B- und Typhus-Bazillen. Wenn wir also eine mehr oder weniger starke Ausbildung unserer Erscheinung auch bei anderen Sera beobachten, so hängt dies mit dem ja nie übereinstimmenden Gehalt an verschiedenenartigen Agglutininen zusammen.

Aus dem Gesagten geht aber auch hervor, mit welchem der beiden bei der Agglutination unterscheidbaren Prozessen, dem spezifischen oder physikalischen, das Phänomen in Beziehung zu bringen ist. Haben wir vorhin dafür bei der Diskussion über geringere oder größere Ausflockbarkeit und andersartige physikalische Faktoren nur einen indirekten Beweis erbringen können, so haben wir in den zwei oben mitgeteilten Beispielen einen *direkten Beweis* dafür zu sehen, *daß das ungleichartige Verhalten der beiderlei Kulturen mit der spezifischen Phase der Antigen-Antikörper-Reaktion in Zusammenhang steht.*

Für die Annahme qualitativer Unterschiede zwischen den beiden verschieden ernährten Bakterien haben wir oben Anhaltspunkte nicht finden können; im Gegenteil kommt man nach den mittels homologen und heterologem Serum angestellten Versuchen mit der Annahme aus, daß die Verschiedenheit in der Zusammensetzung der Bakterienleiber nur eine quantitative ist. Das Phänomen ist verständlich, wenn wir eine

Verschiebung der einzelnen Leibesbestandteile gegeneinander annehmen in dem Sinn, daß von einem bestimmten Agglutinogen das eine Mal mehr, das andere Mal weniger vorhanden ist. Und zwar trifft diese Verschiebung offenbar sowohl die Haupt- als auch die Nebenagglutinogene. Denn wäre das Phänomen nur mit heterologem Serum zu beobachten, so könnte es durch eine geringere Ausbildung der Mitagglutinogene im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden gedeutet werden. Es ist aber, wenn auch in der Regel bei weitem nicht so ausgesprochen, auch bei der Ausflockung durch homologes Serum zu konstatieren, die Veränderung trifft also nicht die Mitagglutinine allein. Wir wissen, daß quantitative Verschiedenheiten der Bakterien in einem aus ihnen gewonnenen Immunserum keineswegs zum Ausdruck zu kommen brauchen, weil der tierische Organismus auf jedes der einzelnen Agglutinogene in einem individuell schwankenden Maße reagiert. Deshalb muß das quantitative Verhältnis der einzelnen Agglutinine zueinander keineswegs dem der entsprechenden Agglutinogene im Bakterienkörper gleichen. Daher spricht die Uebereinstimmung der mit den verschieden ernährten Kulturen hergestellten Immunsera nicht gegen eine unterschiedliche quantitative Zusammensetzung der Bakterienleiber.

Wollen wir uns ein Bild von dieser Differenz in der inneren Struktur der Keime machen, so erinnern wir uns wieder, daß im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden bei Paratyphus B-Bazillen die Oberfläche im Verhältnis zur Bakterienmasse um das Mehrfache vergrößert ist. Die Arbeiten von Braun und Schäffer, Braun und Feiler haben gezeigt, daß im Ektoplasma andere Antigene sitzen als im Endoplasma, und daß dementsprechend von den Agglutininen des Immunserums die einen gegen das Endo-, die anderen gegen das Ektoplasma gerichtet sind. Bei Proteus- und Typhusbazillen geht der Verlust des ektoplasmatischen Geißelapparates mit dem Verlust ganz bestimmter Agglutinogene einher. Wird nun, wie im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden, die Oberfläche gegenüber der Masse verändert, so tritt damit auch eine quantitative Verschiebung der ekto- und endoplasmatischen Leibesbestandteile ein. Danach wechselt also mit dem Ver-

hältnis von Oberfläche zur Masse auch das Verhältnis der einzelnen Agglutinogene zueinander. Eine größere Bakterienoberfläche wird nun eine größere Menge eines bestimmten, nämlich ektoplasmatischen Agglutinins binden. Ist in einer bestimmten Serumverdünnung eine gegebene Menge ektoplasmatischer Agglutinine vorhanden, und wirken diese auf gleiche Anzahl von Bouillon- und Milchsäure-Ammoniak-Bakterien ein, so ist das Mengenverhältnis des Ektoplasma-Agglutinins zu seinem korrespondierenden Antigen bei den beiderlei Kulturen ungleich. Wenn es z. B. bei den Bouillonbakterien wie 1 zu 1 ist, so wird es bei 3mal größerer Oberfläche der Milchsäure-Ammoniak-Bakterien bei diesen Keimen wie 1 zu 3 sein. Es wird also das Serum diesen Keimen gegenüber geringere Wirksamkeit zeigen.

Diese Hypothese könnte unsere Beobachtungen erklären. Sie würde erstens die verschiedene Art der Ausflockung, zweitens die Titerdifferenz verständlich machen; sie könnte drittens das zeitweilige Ueberschießen des Titers der Michsäure-Ammoniak-Kultur erklären. Sie würde viertens auch begreiflich machen, weshalb das Phänomen mit dem einen Serum deutlicher ausfällt als mit einem anderen, wieso es einmal nur in der Art der Flockung, das andere Mal außerdem in der Schnelligkeit der Reaktion und in der Extensität zum Ausdruck kommt. Denn außer der Strukturveränderung der Bakterien kommt noch der Gehalt des Serums an bestimmten Agglutininen in Betracht, so daß demnach beide, Keim und Serum, Anteil an der Ausprägung dieser biologischen Differenz haben. Und schließlich hätte diese Hypothese den Vorteil, auch die ganz andere Erscheinung der erhöhten Empfindlichkeit der Milchsäure-Ammoniak-Bakterien gegen Desinfektionsmittel ebenso durch die Oberflächenvergrößerung verständlich zu machen.

Diese Ergebnisse haben, abgesehen von unserer besonderen Fragestellung, auch ein gewisses methodisches Interesse. Bei einer wissenschaftlich und praktisch so häufig geübten Methode wie der Agglutination ist natürlich die Kenntnis jedes neuen Faktors, der die Agglutinabilität der Bakterien beeinflussen kann, von Wichtigkeit.

II. Erscheinungen bei der Präzipitation verschieden ernährter Paratyphus B-Bazillen.

Unsere Fragestellung, ob verschieden ernährte Keime desselben Stammes eine unterschiedliche stoffliche Zusammensetzung ihres Zelleibes haben, legte es nahe, die Präzipitationsmethode heranzuziehen und zu prüfen, ob auch diese, in der Eiweißdifferenzierung so sehr bewährte Methode, Differenzen zwischen den Bouillon- und Milchsäure-Ammoniak-Bakterien erkennen läßt.

Will man verschiedenartige Keime auf ihren Gehalt an Präzipitinogenen prüfen, so muß man, um vergleichbare Resultate zu bekommen, die Extrakte aus gleichen Bakterienmassen gewinnen. Es ist also dazu zunächst eine zuverlässige Methode zur Bestimmung dieser Größe notwendig. Wir sind bei diesen Versuchen folgendermaßen vorgegangen:

Weil bei der Extraktherstellung größere Bakterienmassen verarbeitet werden müssen, war es wünschenswert, die Keime vom festen, agarhaltigen Nährboden zu gewinnen. Da wir aber nur den agarfreien, flüssigen Milchsäure-Ammoniak-Nährboden als frei von unbekannten chemischen Beimengungen betrachten können, so war zuerst zu prüfen, ob Paratyphus B-Bakterien, die im flüssigen, und solche, die auf festem Milchsäure-Ammoniak-Nährboden gezüchtet waren, bei der Präzipitation gleiches Verhalten zeigen. Derartige Vorversuche ergaben gleiche Niederschlagsbildung durch Extrakte dieser beiden Kulturen, wodurch erwiesen war, daß im sorgfältig gereinigten Stangenagar keine Substanzen enthalten waren, welche für die Präzipitinogenbildung der Paratyphus B-Bazillen von Bedeutung sind. Es konnten also die zu vergleichenden Kulturen von Nährbouillonagar und Milchsäure-Ammoniak-Agar abgeschwemmt werden.

Während nun in flacher Schicht flüssigen Milchsäure-Ammoniak-Nährbodens und einer etwa 8mal höheren Schicht von Bouillon, wie oben besprochen, die Paratyphus B-Bazillen annähernd gleich schnell und gleich üppig wachsen, ist das auf diesen beiden Nährböden, wenn sie in fester Form vorhanden sind, nicht zu erreichen; der Rasen auf dem Nähragar ist erheblich dichter als auf dem Milchsäure-Ammoniak-Agar-Nährboden. Beim Abschwemmen einer gleichen Anzahl von Schrägröhrchen dieser beiderlei Nährböden mit gleichen Flüssigkeitsmengen erhält man also ganz verschiedene Massen von Keimen im Kubikzentimeter Aufschwemmung. Es wurde nun versucht, Emulsionen durch ihre Dichte bezüglich der in ihnen enthaltenen Bakterienmassen zu vergleichen. Es zeigte sich aber bald, daß dieser bei dünnen Aufschwemmungen, wie z. B. bei Agglutinationsversuchen, brauchbare Weg hier nicht gangbar ist. Es wurden aus den zu vergleichenden, dichten Emulsionen Proben genommen, und diese

so weit verdünnt, bis man eine Druckschrift bestimmter Größe durch sie hindurch lesen konnte, und beobachtet, wieviel Flüssigkeit man der einen und wieviel der anderen Probe bis zu diesem Verdünnungsgrade zusetzen mußte, und schließlich daraus das Verhältnis der Bakterienmassen in den beiden Emulsionen berechnet. Aber diese Abschätzungen nach der Dichte der Aufschwemmung erwiesen sich als unsicher, so daß ein anderer Weg gesucht werden mußte. Offensichtlich beruhte diese Schwierigkeit darauf, daß die verschieden ernährten Keime eine so differente Gestalt haben, und daß außerdem die Abschwemmungen vom Nährbouillon-Agar immer leicht gelblich gefärbt, die vom Milchsäure-Ammoniak-Nährboden aber rein weiß sind.

Da es auf gleiche Bakterienmasse, nicht auf die Keimzahl ankam, wurde folgender Weg eingeschlagen: Um nicht nur bei den einzelnen Versuchen vergleichbare Resultate zu haben, sondern alle Versuche ähnlich zu gestalten, wurde als „Standardemulsion“ die Abschwemmung von einem gut gewachsenen Schrägnähragarröhrchen von Paratyphus B-Bazillen mit 4 ccm Flüssigkeit gewählt. So wurden, um ein Beispiel anzuführen, 4 Schrägröhrchen mit je 4 ccm Kochsalzlösung, gleichzeitig einige Kolle-Schalen, die mit Milchsäure-Ammoniak-Agar beschickt waren, mit ca. 6 ccm abgeschwemmt. Gleiche Mengen, z. B. 10 ccm, beider Abschwemmungen wurden, um die häufig sich loslösenden kleinsten Agarstückchen zurückzuhalten, durch feine Silberdrahtnetze, die durch Ausglühen sterilisiert waren, in spitze Zentrifugengläser gegossen, und beide gleich lang, 30 bis 45 Min., eventuell länger, bis zur völligen Ausschleuderung der Keime zentrifugiert. Danach wurde in dem Röhrchen, welches die Bouillonkultur, also den Standardwert, enthielt, die Höhe der Bakterienschicht in der schmalen Spitze des Glases und ebenso der Flüssigkeitsspiegel sorgfältig markiert. Jetzt schon war in beiden Röhrchen die Höhe des Sedimentes vergleichend abschätzbar. Die Bodensätze beider Röhrchen wurden aufgewirbelt, die Nähragarkultur umgegossen, das mit den Marken versehene Glas sterilisiert, gesäubert und wiederum sterilisiert. Danach wurde die Aufschwemmung der Milchsäure-Ammoniak-Bakterien in das markierte Zentrifugenglas gegossen und, falls z. B. die Abschätzung eine geringere Masse von Milchsäure-Ammoniak-Bakterien ergeben hatte, mehr von der Aufschwemmung eingefüllt, so daß die Flüssigkeit oberhalb der Marke stand. Nach Zentrifugieren sollte das aus Milchsäure-Ammoniak-Bakterien bestehende Sediment bis zur unteren Marke reichen, andernfalls muß entweder noch mehr Aufschwemmung hinzugegeben, oder aufgewirbelt und Abschwemmung weggenommen werden, so daß nach nochmaligem Zentrifugieren die Milchsäure-Ammoniak-Bakterien denselben Raum im gleichen Röhrchen einnehmen wie vorher die Bouillonbakterien. Es bleibt nun nur noch übrig, den Flüssigkeitsspiegel mit der oberen Marke in Uebereinstimmung zu bringen. Bei einiger Uebung war meistens nur ein zweimaliges, höchstens dreimaliges Ausschleudern nötig. Auf diese Weise hat man es auch in der Hand, doppelt oder dreifach konzentrierte Emulsionen herzustellen. Dieser etwas umständliche Weg, der einige Stunden in An-

spruch nimmt, lieferte brauchbare Resultate. Es zeigte sich, daß Emulsionen, die nach dieser Methode bestimmte gleiche Bakterienmassen enthielten, nicht gleich trüb erschienen.

Die Extrakte wurden nun so hergestellt, daß sofort nach der oben beschriebenen Einstellung die Bakterien durch Hitze abgetötet, danach Sterilitätsproben angesetzt und nun 48 Stunden bei 37° unter wiederholtem Umschütteln digeriert wurden. Dann ließ sich durch scharfes Zentrifugieren ein klarer Extrakt gewinnen. Gelegentlich wurde, wenn die Bakterien nicht völlig auszuschleudern waren, um klare Extrakte zu bekommen, eine Filtration durch de Haënsche Membranfilter No. 10 vorgenommen.

Es wurden die verschieden ernährten Kulturen entweder mit destilliertem Wasser oder mit physiologischer Kochsalzlösung oder mit 10-proz. Kochsalzlösung extrahiert. Vor der Extraktion wurden die Bakterien entweder 10 Minuten bei 100° oder 1 Stunde bei 65° gehalten und so abgetötet. Diese 6 Paare verschieden gewonnener Extrakte von Bouillon- und Milchsäure-Ammoniak-Paratyphus B-Bazillen wurden untereinander verglichen, denn es lag uns daran, zu versuchen, ob sich je nach der Extraktionsmethode Differenzen zwischen den verschieden ernährten Keimen zeigen würden.

Bei der Präzipitation stehen zwei Versuchsanordnungen zur Verfügung: entweder wird der Extrakt in absteigenden Mengen mit sich gleich bleibenden Serummengen gemischt oder umgekehrt fallende Serumkonzentrationen mit gleichen Quanten des Extraktes zusammen gegeben. Tabelle IX enthält ein Versuchsbeispiel mit beiden Modifikationen.

Wie bei der Agglutination wurde der zeitliche Verlauf, die Intensität der Ausfällung und die Titerhöhe verfolgt. Dazu war die Ringprobe wenig brauchbar. Sie ist zwar empfindlicher als die Mischprobe, doch ließen sich die Intensitätsgrade dabei kaum abschätzen. Es wurde deshalb bei allen Versuchen Extrakt und Serum sofort unter Umschütteln gemischt, gleich abgelesen, dann 1 Stunde bei 37° gehalten, danach zum zweitenmal und nach 24-stündigem Aufenthalt im Eisschrank zum letztenmal abgelesen.

Die Versuche wurden mit der 80.—100. Passage von Paratyphus B-Bazillen im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden ausgeführt.

Bei Einhaltung dieser Methode zeigte sich nun ein deutlicher konstanter Unterschied im Verhalten der Bouillon- und der Milchsäure-Ammoniak-Bakterien. Das Phänomen geht aus der Tabelle mit aller Deutlichkeit hervor.

Tabelle IX.

Versuch 10 (28. V. 20): Präzipitation verschieden ernährter Paratyphus B-Bazillen mit Paratyphus-Immunsera, die mit den verschieden ernährten Keimen gewonnen sind.

Versuchsanordnung						Versuchsergebnis: Paratyphus B-Immunserum, gewonnen mit „Bouillon-Bakterien"						Versuchsergebnis: Paratyphus B-Immunserum, gewonnen mit „Milchs.-Ammon.-Bakt."					
						sofort		nach 4 Std.		nach 24 Std.		sofort		nach 4 Std.		nach 24 Std.	
Röhrchen	Extrakt-verdünnung	Serum-verdünnung	Bakterien-extrakt ccm	Paratyph. B-Immun-serum ccm	0,85-p. NaCl-Lös. ccm	„Bouillon-Bakterien"-Extrakt	„Milchs.-Ammoniak-Bakterien"-Extrakt	„Bouillon-Bakterien"-Extrakt	„Milchs.-Ammoniak-Bakterien"-Extrakt	„Bouillon-Bakterien"-Extrakt	„Milchs.-Ammoniak-Bakterien"-Extrakt	„Bouillon-Bakterien"-Extrakt	„Milchs.-Ammoniak-Bakterien"-Extrakt	„Bouillon-Bakterien"-Extrakt	„Milchs.-Ammoniak-Bakterien"-Extrakt	„Bouillon-Bakterien"-Extrakt	„Milchs.-Ammoniak-Bakterien"-Extrakt
1	1:5	1:10	0,2	0,1	0,7	(++)	++	±	++	±	+++	(+)	+	(++)	++	±	+++
2	1:10	1:10	0,1	0,1	0,8	(±)	±	(++)	±	±	###	—	±	—	++	(+)	++
3	1:20	1:10	0,1 d. Verd. 1:2	0,1	0,8	—	(++)	—	(++)	(+)	+++	—	(+)	—	(+)	—	(+)
4	1:50	1:10	0,1 d. Verd. 1:5	0,1	0,8	—	—	—	(±)	—	(±)	—	—	—	(±)	—	(±)
5	1:100	1:10	0,1 d. Verd. 1:10	0,1	0,8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	1:10	1:10	0,1	0,1	0,8	(++)	+	±	++	+	++	(+)	±	±	++	±	++
7	1:10	1:20	0,1	0,1 d. Verd. 1:2	0,8	—	±	(+)	±	(++)	±	—	(++)	(+)	++	(+)	++
8	1:10	1:40	0,1	0,1 d. Verd. 1:4	0,8	—	(±)	(±)	(+)	(+)	(+)	—	—?	(+)	±	(+)	+
9	1:10	1:80	0,1	0,1 d. Verd. 1:8	0,8	—	—	—	?	(±)	(±)	—	—	—	(+)	(±)	±
10	1:10	1:160	0,1	0,1 d. Verd. 1:16	0,8	—	—	—	—	—	(±)	—	—	—	(±)	—	(±)
11	1:10	1:320	0,1	0,1 d. Verd. 1:32	0,8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Versuchskontrollen:																	
12	—	1:10	—	0,1	0,9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
13	1:5	—	0,2	—	0,8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
14	—	—	0,2	0,1 N.-S.	0,7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
15	—	—	—	0,1 N.-S.	0,9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Die Keime wurden durch einstündiges Erhitzen auf 65° abgetötet und mit 10-proz. Kochsalzlösung extrahiert.

Zeichenerklärung: Klärung der Flüssigkeit mit dichtem Niederschlag: ###
Flocken, z. T. suspendiert, z. T. als Bodensatz: +++

Trübung: starke: ++; mittlere: +; schwache: ±

Opaleszenz: starke: (++); mittlere: (+); Spur: (±)

N.-S. = Normalserum.

Die Versuche zeigten, daß der Extrakt aus den im einfachen künstlichen Nährboden aufgewachsenen Keimen mit beiden Immunsera, einerlei, ob sie mit Bouillonkultur oder mit Milchsäure-Ammoniak-Kultur hergestellt waren, eine sehr viel stärkere Trübung resp. Fällung gibt als der aus der gleichen Masse von Bouillonbakterien gewonnene. Man sieht sowohl im Titer wie in der Stärke der Niederschlagsbildung, wie in der Schnelligkeit der Reaktion einen deutlichen Unterschied. Nicht immer ist die Titerdifferenz so ausgesprochen wie in Tabelle IX, doch ist sie in sämtlichen bis zur Titergrenze führenden Versuchen mit einer Ausnahme vorhanden gewesen. Am deutlichsten kommt das Phänomen in der Stärke der Trübung zum Ausdruck. Sie fehlte in 43 Versuchen nur einmal, ist also in nahezu 100 Proz. reproduzierbar; auf die Ausnahme wird weiter unten eingegangen. Das Versuchsbeispiel zeigte weiter, daß das Phänomen sowohl bei fallenden Extraktmengen wie bei fallenden Serummengen zu beobachten ist. Im zweiten Falle pflegt es weniger deutlich zu sein.

Die Ursache für diesen verschiedenen Ausfall der Präzipitation haben wir im Extrakt zu suchen. Der aus Milchsäure-Ammoniak-Bakterien hergestellte Extrakt ist reicher an Präzipitinogen als der aus Bouillonbakterien gewonnene. Das könnte natürlich durch verschieden große Bakterienmassen, die zur Extraktion kamen, bedingt sein; und deshalb war es nötig, eine zuverlässige Methode zur Herstellung von Extrakten aus gleichen Massen, wie sie oben beschrieben wurde, auszuarbeiten.

Außerdem aber mußte man sicher sein, daß nicht die innerhalb der einzelnen Versuchsschwankungen liegenden Ausschläge etwa ein solches Resultat vortäuschen; dies ist schon deshalb zu verwerfen, weil ja der Ausschlag in allen Versuchen in derselben Richtung erfolgte. Trotzdem wurden gleichzeitig 6 gleichartige Präzipitationsversuche mit gleichem Extrakt und gleichem Serum angestellt; die Schwankungen im Ausfall waren sehr gering und reichten bei weitem nicht an die beobachteten Differenzen zwischen den verschieden ernährten Keimen heran.

Wir wollten uns nun davon überzeugen, um wieviel größer die Masse der Bouillonbakterien sein mußte, um eine gleich starke Niederschlagsbildung wie die einfache der Milchsäure-Ammoniak-Bakterien zu geben. Auf diese Weise ließ sich

auch einmal zahlenmäßig die aufgefundene biologische Differenz bestimmen. Einen solchen Versuch zeigt Tabelle X. Darin wurde der Extrakt aus Bouillonbakterien mit dem der gleichen Masse Milchsäure-Ammoniak-Bakterien und dem aus der doppelten Masse Bouillonkultur verglichen.

Tabelle X.

Versuch XVI (3. VI. 20): Vergleichende Präzipitation mit Extrakten aus einfacher Menge von Bouillon- und Milchsäure-Ammoniak-Bakterien und doppelter Menge von Bouillon-Bakterien.

Extraktverdünnungen	1:5	1:10	1:20	1:50	1:100	1:200
Immunserumverdünnungen	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10
„Bouillon-Bakterien“-Extrakt	+++	+++	+	±	±	(+)
„Milchs.-Ammon.-Bakt.“-Extrakt	++	++	╪╪╪╪	╪╪╪╪	╪╪╪╪	╪╪╪╪
„Bouillon-Bakterien“-Extrakt aus der doppelten Bakterienmasse	++	╪╪╪╪	+++	+	±	(+)

Versuchsanordnung und Zeichenerklärung wie in Tabelle IX. — Paratyphus B-Immunserum vom Bouillonstamm. Die 10 Minuten auf 100° C erhitzten Bakterien wurden mit physiologischer Kochsalzlösung 48 Stunden extrahiert.

Aus diesem Versuch ging hervor, daß der Unterschied zwischen dem einfachen und doppelten Bouillonbakterienextrakt nur ganz gering ist und bei weitem nicht an die Differenz zwischen den verschieden ernährten Keimen heranreicht. In anderen Versuchen zeigte sich, daß der Extrakt aus der dreifachen Menge Bouillonbakterien einen ungefähr gleich starken Niederschlag gibt, wie der aus der einfachen Menge Milchsäure-Ammoniak-Bakterien. Das obige Versuchsbeispiel ist deshalb zur Wiedergabe gewählt worden, weil es die Verschiedenheit der beiden Extrakte auch insofern sehr deutlich zeigt, als es bei den an Präzipitinogen reicheren eine Hemmung der Präzipitation durch Ueberschuß des Antigens erkennen läßt, während diese beim einfachen Bouillon-Bakterienextrakt fehlt. So kommt es, daß bei größeren Extraktmengen die Bouillonkultur stärkere Präzipitate gibt als die Milchsäure-Ammoniakkultur, bei fortschreitender Verdünnung der Extrakte aber dieses Verhältnis sich umgekehrt und die Milchsäure-Ammoniakkultur auch dann noch vollständige Präzipitation zeigt, wenn

die Bouillonkultur kaum noch eine Andeutung davon erkennen läßt.

Aus den vorstehenden Versuchen sind wir also zu dem Schlusse berechtigt: Die im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden aufgewachsenen Keime sind um ein Mehrfaches reicher an Präzipitinogenen als die Bouillonkultur; d. h. die stoffliche Zusammensetzung der beiden ungleich ernährten Modifikationen desselben Stammes ist verschieden. Wir sind also zu demselben Resultat wie bei der Agglutination gekommen. Auch die Präzipitation berechtigt uns demnach zu der Annahme, daß sich die innere Struktur der Bakterien mit der Art ihrer Ernährung ändert.

Wieder erhebt sich die Frage, ob diese Differenz eine qualitative oder quantitative ist. Die Antwort geht aus Tabelle IX hervor. Die beiden Sera, von denen eines mit abgetöteter Bouillonkultur, das andere mit abgetöteten Milchsäure-Ammoniak-Bakterien durch subkutane und intravenöse Injektionen von Kaninchen gewonnen wurden, wiesen keine Unterschiede auf. Da beide Sera sich gleich verhalten, also gleichartige Antikörper enthalten, können die zugehörigen Antigene nicht artverschieden sein. Wiederum werden die Beobachtungen durch die Annahme quantitativer Verschiedenheit, eines größeren Reichtums an einer bestimmten Substanz, erklärt.

Ist es nun möglich, über die Eigenschaften dieses Stoffes, an welchem die Milchsäure-Ammoniak-Bakterien reicher sind, irgendeinen Aufschluß zu erlangen? Wie oben beschrieben, wurden die Bakterienleiber mit destilliertem Wasser oder mit physiologischer Kochsalzlösung oder mit 10-proz. Kochsalzlösung extrahiert. Ein eingehender Vergleich dieser Extrakte ergab keinen erkennbaren Einfluß dieser verschiedenen Extraktionsmittel auf das Resultat der Präzipitation; immer war der Milchsäure-Ammoniak-Bakterienextrakt reicher an Präzipitinogenen als der aus Bouillonbakterien.

Außerdem aber wurde die Extraktion entweder nach Fällung der Bakterienproteine durch Kochen oder aber nach schonender Abtötung bei 65° C vorgenommen. Ein Vergleich dieser beiden Extrakte ergab nicht ganz überein-

stimmende Resultate. Die Differenz zwischen den verschieden ernährten Kulturen fiel geringer aus, wenn die Keime 1 Stunde bei 65° abgetötet und dann extrahiert wurden, als wenn sie 10 Minuten gekocht worden waren. Der oben erwähnte einzige Versuch, bei welchem eine Differenz der verschieden ernährten Keime fehlte, ist mit einem derartigen Extrakt angestellt worden. Wurden nun diese 65°-Extrakte 10 Minuten gekocht, so war in drei Versuchen übereinstimmend einmal mehr, einmal weniger ausgesprochen eine Verstärkung der Differenz zwischen Bouillon- und Milchäure-Ammoniak-Bakterien bis zu dem üblichen Grad zu beobachten; und zwar ergab der Vergleich zwischen den gleichzeitig mit einem gekochten und ungekochten Teil desselben 65°-Extraktes angestellten Versuchen, daß der Abstand zwischen den Bouillonbakterien und den Milchsäure-Ammoniak-Bakterienextrakt dadurch vergrößert worden war, daß die Ausfällungen mit dem Bouillon-Bakterienextrakt durch das Kochen geringer wurden, während sie mit dem Milchsäure-Ammoniak-Bakterienextrakt die gleichen blieben. Diese Beobachtung konnte bei 2 Versuchen, in denen destilliertes Wasser, und einem Versuche, bei dem 10-proz. Kochsalzlösung zur Extraktion benutzt wurde, und mit zwei verschiedenen Sera gemacht werden. Außerdem stellte sich heraus, daß der Unterschied zwischen den verschieden ernährten Kulturen bei ganz frischen 65°-Extrakten geringer war, als nach 2- bis 8-tägigem Aufenthalt im Eisschrank, so daß ein solches Aufbewahren dieser 65°-Extrakte eine ähnliche Wirkung haben konnte, wie das nachträgliche Erhitzen auf 100°. Auch hierbei gingen die Extrakte aus Bouillonbakterien in ihrer Wirksamkeit zurück, während die aus den Milchsäure-Ammoniak-Bakterien unverändert blieben. Bei Extrakten, die aus den bei 100° abgetöteten Keimen gewonnen waren, wurden derartige Beobachtungen nicht gemacht.

Sofern wir aus diesen wenigen Versuchen Schlüsse ziehen dürfen, können wir darin einen Hinweis darauf erblicken, daß die Präzipitinogene, an welchen die Milchsäure-Ammoniak-Bakterien reicher sind, thermostabil sind, bei den Bouillonbakterien dagegen sehr labile und besonders thermolabile Antigene in größerer Menge vorhanden sind. Es wäre dem-

nach eine Doppelnatur der Rezeptoren, wie bei den Agglutinogenen, auch bezüglich der Präzipitinogene beobachtet. Weil und Felix[1]) haben auch bereits einige Versuche mitgeteilt, in denen auf dem Weg über die Immunisierung die Doppelnatur der Rezeptoren für die Präzipitation gezeigt ist. Wir stehen also keiner bisher unbekannten Tatsache gegenüber. Hier in unserem Zusammenhang ist das Wichtigste, daß wir Grund zu der Annahme haben, daß der Gehalt an thermolabilen und thermostabilen Leibesbestandteilen je nach der Ernährung verschieden ist.

Wir haben also bei der Agglutination eine schwächere Ausflockung der Milchsäure-Ammoniak-Bakterien, bei der Präzipitation eine stärkere Niederschlagsbildung als durch die Bouillonkultur beobachtet. Dabei war es gleichgültig, mit welcher der beiden Kulturen das Serum gewonnen worden war. Sind diese sich auf den ersten Blick widersprechenden Befunde miteinander in Einklang zu bringen? Halten wir an der Verschiedenheit der endo- und ektoplasmatischen Agglutinogene fest, so haben wir, wie besprochen, in der Oberflächenvergrößerung der Milchsäure-Ammoniak-Bakterien eine Erklärungsmöglichkeit für ihre geringere Agglutinabilität gesehen. Auf die gleiche Weise erklärt sich zwanglos das bei der Präzipitation beobachtete Phänomen. Ist nämlich bei den Milchsäure-Ammoniak-Bakterien im Gegensatz zu den Bouillonbakterien die Oberfläche im Verhältnis zum Körperinhalt vergrößert, und stellt man aus gleichen Gesamtmassen beider Kulturen Extrakte her, so wird der Milchsäure-Ammoniak-Bakterienextrakt reicher an gewissen Antigenen, nämlich den Oberflächenantigenen sein. Demnach ist es dieselbe Substanz, welche, im Körper der Milchsäure-Ammoniak-Bakterien vorhanden, die geringere Agglutinationswirkung durch vermehrten Agglutininverbrauch verursacht, außerhalb der Bakterienzelle im Extrakt befindlich, die verstärkte Präzipitatbildung bewirkt. Und tatsächlich nehmen

---

1) Weil und Felix, l. c.

wir ja seit den Arbeiten von Kraus und Joachim[1]) an, daß Agglutinogene und Präzipitinogene identisch sind (Paltauf).

Die Auffassung also, daß die Gestalts- und Oberflächenveränderung der Keime im einfachen künstlichen Nährboden zu verschiedenartigem biologischen Verhalten Veranlassung gibt, wäre geeignet, die 3 wesentlichsten aufgefundenen Phänomene einheitlich unserem Verständnis näher zu bringen. Die Oberflächenvergrößerung bewirkt demnach eine erhöhte Empfindlichkeit gegen die von außen eindringenden chemischen, physikalischen und chemisch-physikaliscken Schädigungen, sie illustriert gewissermaßen die quantitative Verschiebung der Leibesbestandteile bei verschieden ernährten Bakterien und kann bei der Agglutination die geringere Ausflockung, bei der Präzipitation die stärkere Niederschlagsbildung durch größeren Gehalt an bestimmten (wahrscheinlich thermostabilen) Substanzen erklären.

Schließlich ist wiederum zu betonen, daß diese Befunde für die Methodik der Bakterienpräzipitation von Bedeutung sind. Wir versuchten, uns darüber zu unterrichten, wie stark sich der je nach der Art der Ernährung wechselnde Gehalt an bestimmten Präzipitinogenen bemerkbar macht. Es wurde deshalb untersucht, wie groß der Unterschied zwischen Bouillon- und Milchsäure-Ammoniak-Bakterien desselben Stammes im Vergleich zu der Differenz zwischen den Bouillonkulturen zweier verschiedener Bakterienrassen ist. Mischte man einerseits Extrakte von in Bouillon aufgewachsenen Gärtnerbazillen mit Gärtnerimmunserum, andererseits einen Extrakt aus gleicher Masse von in Bouillon aufgewachsenen Paratyphus B-Bazillen mit Gärtnerimmunserum, so fiel die Präzipitation mit dem homologen Stamm stärker aus als mit dem heterologen. Diese Differenz war aber in unseren Versuchen geringer als der gleichzeitig beobachtete Unterschied in der Niederschlagsbildung, wenn Bouillon- und Milchsäure-Ammoniakkulturen von Paratyphus B-Bazillen mit Gärtnerimmunserum, oder wenn Bouillon- oder Milchsäure-Ammoniakkulturen von Gärtnerbazillen mit Paratyphus B-Immunserum zusammen-

1) Kraus und Joachim, Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 36, p. 662 und Bd. 37, p. 73.

gegeben wurden. Mit anderen Worten: die Differenz im Ausfall der Präzipitation der verschieden ernährten Keime des gleichen Stammes kann größer sein, als die Differenz in der Niederschlagsbildung zweier verschiedener Bakterienrassen. Daraus geht hervor, wie bedeutungsvoll die Art der Ernährung für vergleichende Bakterienpräzipitationen ist.

F. Vergleich zwischen hungernden und aus wenigen einfachen Bausteinen sich ernährenden Bakterien.

Es reizt, abschließend den hier besprochenen Einfluß verschiedenartiger Ernährung mit der Wirkung, die eine Unterernährung auf Bakterien hat, zu vergleichen. Eine solche Ernährungsstörung haben wir in den schon zitierten Versuchen von Braun und seinen Mitarbeitern zu sehen, wo einmal durch Nahrungsentziehung, das andere Mal durch Karbolwirkung ebenfalls eine Veränderung von serologischen Eigenschaften der Keime hervortrat. Diese aber ist nun interessanterweise anderer Natur als die hier im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden beschriebene: gegenüber chemischen und physikalischen Schädigungen sind Proteus- und Typhusbazillen, weder durch Unterernährung noch durch Karbolwirkung empfindlicher geworden, ganz anders als die hier besprochenen, schwere synthetische Arbeit leistenden Bakterien im einfachen künstlichen Nährboden. Was aber die Antigene betrifft, bildet sich bei Typhus- und Proteusbazillen im Hunger und bei Karbolwirkung ein wirklicher Defekt von Agglutinogenen aus. Mit dem Geißelverlust kommt es zu einem Schwund von Rezeptoren, und damit zu einer qualitativen Verschiedenheit zwischen Kulturen, die auf nährstoffreichem und auf nährstoffarmem, resp. karbolhaltigem Bouillonagar gewachsen sind. Im Gegensatz dazu kam es in den hier besprochenen Züchtungsversuchen im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden nur zu einer quantitativen Verschiebung in der Zusammensetzung des Zelleibes.

Man könnte nun fragen, ob die Hunger- resp. Karbolbakterien außer dem Defekt noch nebenbei eine quantitativ verschiedene Zusammensetzung ihres Körpers zeigen, sodaß also nicht nur eine Substanz ihres Leibes fehlt, sondern dafür eine andere in größerer Menge vorhanden ist. Dies ließ sich

bei Präzipitationsversuchen tatsächlich zeigen. Typhusbazillen wurden auf Nähragar mit 0,1 Proz. Phenol gebracht und darauf 20 Passagen gezüchtet; dann wurden aus gleichen Massen von Typhusbazillen, die entweder auf dem üblichen Nähragar oder auf dem karbolhaltigen Nährboden gewachsen waren, Extrakte hergestellt, indem die Keime mit physiologischer Kochsalzlösung abgespült, 10 Min. auf 100° erhitzt und dann 48 Stunden bei 37° extrahiert wurden. *Präzipitationsversuche mit 3 verschiedenen Typhusimmunsera ergaben nun übereinstimmend eine deutlich stärkere Niederschlagsbildung des Serums mit dem Karbolbakterienextrakt als mit dem des Bouillonstammes.*

Und ein ganz entsprechendes Resultat zeigten Versuche mit hungernden Paratyphus B-Bazillen, von denen in Tabelle XI ein Beispiel wiedergegeben ist. Dabei also wurden den Bakterien nicht, wie im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden, wenige einfache Bausteine in ausreichender Menge, sondern eine quantitativ nicht völlig ausreichende Ernährung durch Verdünnung der Bouillon gegeben. Die Paratyphus B-Bazilllen wurden auf Schrägarröhrchen von Nährbouillonagar gebracht, in denen die Nährbouillon entweder auf das 5-fache oder auf das 10-fache mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt war, so daß den Keimen nur $^1/_5$ oder $^1/_{10}$ der sonst üblichen Nährstoffmengen zur Verfügung standen. Auf diesen beiden Hungernährböden wurden sie in 20 Passagen gezüchtet. Sie wuchsen darauf in zartem Rasen als sehr kurze, feine Stäbchen, also ganz anders aussehend, als die langen, schlanken Keime im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden. Diese beiden Hungerstämme wurden nun mit der auf üblichem Nähragar gezüchteten Kultur, die wir der Kürze halber als „Ausgangsstamm" bezeichnen wollen, und mit einer Milchsäure-Ammoniakkultur desselben Stammes bezüglich ihres Gehaltes an Präzipitinogenen verglichen. Aus den 4 Kulturen wurden Extrakte hergestellt, wobei nach der oben beschriebenen Methode sorgfältigst bestimmte, *gleiche* Massen von Keimen zur Extraktion gelangten. Fallende Mengen dieser Extrakte wurden mit Immunserum, das mit dem Ausgangsstamm hergestellt war, gemischt.

Tabelle XI.

Versuch 54 (15. XI. 20): Vergleichende Präzipitation mit Extrakten aus Bouillonkultur, hungernden Bouillonkulturen und Milchsäure-Ammoniakkultur.

Verdünnungen der Extrakte	Verdünnungen des Serums	Extrakt, gewonnen aus Paratyphus B-Bazillen, die gewachsen sind auf:			
		Nährbouillon mit 2-proz. Agar-Agar	1 Teil Nährbouillon auf 5 Teile phys. Kochsalzlös. mit 2-proz. Agar-Agar	1 Teil Nährbouillon auf 10 Teile phys. Kochsalzlös. mit 2-proz. Agar-Agar	Milchsäure-Ammoniak-Nährboden mit 2-proz. Agar-Agar
1:5	1:10	++	+++	###	###
1:10	1:10	+	++	###	+++
1:50	1:10	(+)	(+)	(++)	(++)
1:100	1:10	—	—	(±)	(+)

Paratyphus B-Immunserum vom Ausgangsstamm. Bakterien bei 100° 10 Minuten abgetötet und mit physiologischer Kochsalzlösung 48 Stunden digeriert. Zeichenerklärung wie in Tabelle IX.

Und es zeigte sich, daß dieses Immunserum mit dem Ausgangsstamm die schwächste, mit den Hungerstämmen eine viel stärkere Präzipitation gab. Wie Tabelle XI zeigt, war die Niederschlagsbildung um so stärker, je ausgesprochener die Unterernährung der Keime gewesen war. Die Bakterien, denen nur $^1/_{10}$ der Nährstoffmenge des Ausgangsstammes zur Verfügung gestanden hatte, gaben die stärkste Reaktion; und diese war noch intensiver, als sie der Extrakt aus den Milchsäure-Ammoniak-Bakterien lieferte.

Es muß also im Hunger von bestimmten Präzipitinogenen relativ mehr gebildet werden, als bei reichlicher Ernährung. Und das gleiche ist, wie oben gezeigt, auf karbolhaltigen Nährböden der Fall. Es geht demnach bei Hunger und Karbolwirkung mit dem Verlust einer Substanz eine relative Anreicherung einer anderen einher.

Vergleichen wir also die Einflüsse der Unterernährung und des Wachstums in einfachen künstlichen Nährböden auf die stoffliche Zusammensetzung der Bakterien, so sehen wir, daß es sich dabei nicht um das gleiche handelt. Bei den im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden aufgewachsenen Paratyphus B-Bazillen kommt es nur zu einer quantitativen Verschiebung einzelner Leibessubstanzen gegeneinander, bei länger dauern-

der Hunger- und Karbolwirkung aber außerdem zu einem völligen Defekt bestimmter Agglutinogene. Wir erkennen also, daß es sich bei den in dieser Veröffentlichung beschriebenen Verschiedenheiten zwischen Milchsäure-Ammoniak- und Bouillon-Paratyphus B-Bakterien nicht um die Wirkung einer Unterernährung, sondern eines andersartigen, große synthetische Leistungen vollbringenden Stoffwechsels handelt.

Die Methode der Züchtung in einfachen künstlichen Nährböden, welche sich dadurch auszeichnen, daß sie nur wenige und bekannte chemische Körper enthalten und deshalb einfachere und übersichtlichere Ernährungsverhältnisse bieten, erlaubte es also, etwas von der Bedeutung des Stoffwechsels für die Biologie der Bakterien zu erkennen.

Zusammenfassung.

Zusammenfassend ergab der Vergleich zwischen Kulturen desselben Paratyphus B-Stammes, die in Bouillon und Milchsäure-Ammoniak-Nährboden aufgewachsen waren:

1) Es ist vorwiegend die assimilatorische Seite des Bakterienstoffwechsels, welche bei der Entwicklungshemmung der Keime durch chemische Desinfektionsmittel betroffen wird; denn im Milchsäure-Ammoniaknährboden wirken Chinin, Salizylsäure, Trypaflavin, Karbol, Sublimat stärker hemmend als in Bouillon. Bei Verbesserung des einfachen Nährbodens durch Traubenzucker ändert sich diese Differenz nicht; sie gleicht sich erst durch Zusatz einer Aminosäure oder von Pepton aus.

2) Die im einfachen künstlichen Nährboden aufgewachsenen Keime sind empfindlicher gegen keimtötende chemische Einflüsse; von Karbol und Sublimat werden die Milchsäure-Ammoniak-Bakterien nach ihrer Uebertragung in Kochsalzlösung innerhalb kürzerer Zeit abgetötet als die in dasselbe Medium gebrachte Bouillonkultur des gleichen Stammes; es genügen geringere Sublimatmengen zur Vernichtung der Milchsäure-Ammoniakkultur.

3) Die Vermehrung der Paratyphus B- und Gärtner-Bazillen im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden wird durch Temperaturen gehemmt, die den gleichen Stämmen rasches Wachs-

tum in Bouillon gestatten. Die mühsam im einfachen künstlichen Nährboden entwickelten Keime werden nach ihrer Uebertragung in Kochsalzlösung durch geringere Hitzegrade abgetötet, als die im gleichen Medium aufgeschwemmten Bouillonbakterien.

4) Die im Milchsäure-Ammoniaknährboden aufgewachsenen Paratyphus B- und Gärtner-Bazillen werden bei der Säure-Agglutination nach Michaelis und Beniasch stärker und in zahlreicheren Wasserstoffionenkonzentrationen ausgeflockt als die Bouillonkultur.

5) Die im Milchsäure-Ammoniaknährboden aufgewachsenen Paratyphus B-Bazillen werden von Paratyphus B-Immunsera, gleichgültig, ob sie mit Milchsäure-Ammoniakkultur oder mit Bouillonkultur hergestellt sind, schwächer agglutiniert; besonders aber werden sie von heterologen Sera, Typhus- und Gärtner-Serum schwächer beeinflußt als die Bouillonbakterien desselben Stammes.

6) Extrakte aus Milchsäure-Ammoniakkulturen geben mit Paratyphus B-Immunsera, einerlei, ob sie mit Milchsäure-Ammoniak- oder Bouillonbakterien gewonnen sind, stärkere Präzipitationen als die Extrakte aus Bouillonbakterien desselben Paratyphus B-Stammes.

7) Diese Tatsachen lassen darauf schließen, daß Keime, die unter großen synthetischen Leistungen in Milchsäure-Ammoniaknährböden, und solche, die in Nährbouillon aufgewachsen sind, verschiedenartige stoffliche Zusammensetzung haben. Diese Differenz reicht aber nicht über die Grenzen hinaus, welche eine Bakterienrasse von der anderen trennt.

Die serologischen Unterschiede zwischen Bouillon- und Milchsäure-Ammoniakbakterien sind anderer Natur als die zwischen gut genährten und hungernden Bouillonbakterien. Beim Wachstum im einfachen künstlichen Nährboden tritt nur eine quantitative Verschiebung einzelner Leibesbestandteile gegeneinander ein, während es bei länger dauernder Unterernährung außerdem zu einem völligen Defekt von ektoplasmatischen Leibesbestandteilen kommt.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Leipzig
(Geheimrat Kruse).]

Zur Differenzierung säurefester Bakterien nach Untersuchungen am Auge.

Von Professor Dr. **Arthur Seitz.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 24. August 1921.)

Seit den Untersuchungen P. Baumgartens und der Tübinger Schule, welche wiederum auf ältere Ergebnisse von Cohnheim und Salomonsen fußten, wissen wir, daß das Kaninchenauge ein äußerst feines Reagens darstellt für den Nachweis der Tuberkulose. Nach Einbringung kleinster Partikeln tuberkulösen Gewebes in die vordere Augenkammer oder auch, wie hauptsächlich Schieck[1]) in ausgedehnten Versuchen später nachwies, durch intraokulare Injektion von Bazillenemulsion, gelang es, Unterschiede in der Pathogenität festzulegen und differentialdiagnostisch den Typus humanus vom Typus bovinus zu trennen. Die genaue Differenzierung der Gruppe der Säurefesten durch morphologische Merkmale, Färbung, Agglutinationen und Wachstumsverschiedenheiten ist nach Kolle, Schloßberger und Pfannenschmidt[2]) nicht möglich, während die Beobachtung der Temperaturgrenzen ihres Wachstums eine scharfe Grenze ziehen läßt. Unter anderen konnte Lubarsch[3]) zeigen, daß bei genügend großen Mengen die meisten saprophytischen Säurefesten histologische Veränderungen im Tierkörper hervorzurufen imstande sind, welche man von denen bei echter Tuberkulose kaum unterscheiden kann. Eine absolute Abgrenzung der echten Tuberkel-

1) Veröffentlichung d. Rob. Koch-Stiftung, 1913.

2) Dtsch. med. Wochenschr., 1920, No. 44; Arbeiten a. d. Inst. f. exper. Therapie, 1921.

3) Zeitschr. f. Hyg., Bd. 33.

bazillen von den tuberkuloseähnlichen war auf dem gewöhnlich beschrittenen Wege also sehr schwer.

In folgendem soll über einige Versuche am Kaninchen, teilweise auch am Meerschweinchenauge berichtet werden, welche vor Jahresfrist zu dem Zwecke aufgestellt wurden, verschiedene Säurefeste auf ihre Pathogenität und Verhalten an der, wie man erwarten konnte, hierzu besonders geeigneten Iris zu prüfen (s. auch Igersheimer und Schloßberger, welche zur Prüfung der Passagestämme Säurefester sich des Meerschweinchenauges bedienten, Dtsch. med. Wochenschr., 1920, No. 19). Es diente uns hierzu tuberkulöses Gewebsmaterial aus verkästen miliaren Tuberkeln mit positivem Bazillenbefund vom Meerschweinchen, sowie Reinkulturen von echten Tuberkelbazillen des Typus humanus und bovinus, von Kaltblütertuberkelbazillen der Schildkrötenstamm Friedmann sowie der Piorkowskische Schildkrötenstamm „Chelonin“, saprophytische Säurefeste aus Milch und Thimoteegras.

Bei der Uebertragung von tuberkulösem Gewebsmaterial in die vordere Kammer wurde so vorgegangen, daß am Limbus mit einer Lanze eingestochen wurde und nach Abfluß einer geringen Menge des Kammerwassers ein kleinlinsengroßes Fragment eingebracht wurde. Trotz peinlichster Asepsis sind dabei Tierverluste durch eintretende postoperative Infektion des Auges unvermeidlich. Die Bulbi wurden in Celloidin sowie Paraffin geschnitten, gefärbt wurde nach v. Gieson bzw. nach Gram.

Wert wurde auf eine genaue wiederholte klinische Diagnose gelegt, sowie auf eine genaue pathologische Durchmusterung der Bulbi. Es erhellt aus unseren Versuchen, wie unumgänglich nötig für eine scharfe Umgrenzung der Veränderungen am Kaninchenauge die fortlaufende klinische Kontrolle ist (s. beispielsweise Kaninchen 12). Verglichen mit diesem klinischen Verlauf, gewinnt schließlich der pathologisch-anatomische Befund erst seine volle Bedeutung. (Den Herren Kollegen Prof. Goldschmidt von der Augenklinik und Prof. Herzog vom Pathologischen Institut sei auch an dieser Stelle für die liebenswürdige Kontrolle der klinischen Befunde bzw. der pathologischen Präparate mein bester Dank ausgesprochen.)

Tuberkelbazillen in vorderer Augenkammer am Kaninchen.

Typus humanus.

Kanichen No. 4.

16. 1. 20. Ein linsengroßer Tuberkel aus Milz von tuberkul. Meerschweinchen (No. 240) = tuberkulöses Kontrolltier).

26. 1. 20. } Vereiterung der vorderen Kammer. Panophthalmie, Ausstriche
12. 2. 20. } ergeben sterilen Eiter, ebenso Kultur.

16. 3. 20. Enukleation.
Pathologisch-anatomischer Befund: Keine Anhaltspunkte für Tuberkulose.

Kaninchen No. 6.

19. 1. 20. Kleinlinsengroßer Tuberkel aus Leber von Meerschweinchen 147 (tuberkulöses Kontrolltier).

5. 2. 20. Lupenbetrachtung läßt Knötchen in Iris und Cornea erkennen, die tuberkulös erscheinen.

12. 3. 20. Chronische Iridocyclitis mit Seclusio pupillae.

17. 3. 20. Stat. id.

17. 4. 20. Keine typische kinische Tuberkulose.

4. 6. 20. Exsudative Iridocyclitis sehr nach Tuberkulose aussehend.

5. 6. 20. Enukleation.
Pathologisch-anatomischer Befund: Keine sichere Tuberkulose.

Kaninchen No. 7.

26. 1. 20. Kleinlinsengroßer Tuberkel aus Milz von Meerschweinchen 43 (tuberkulöses Kontrolltier).

16. 2. 20. Exsudative Iridocyclitis sehr nach Tuberkulose aussehend. Nach Resorption der Exsudation, Enukleation.
Pathologisch-anatomischer Befund: Stellenweise Zellenanhäufungen epitheloiden Charakters, aber keine sichere Tuberkulose.

Durch Einimpfung tuberkulösen Gewebes mit Tuberkelbazillen des Typus humanus gelang es nicht, eine progrediente Tuberkulose des vorderen Bulbusabschnittes hervorzurufen. In einem Falle, Kaninchen No. 6, entstanden nach etwa 3 Wochen verdächtige Knötchen in Iris und Cornea, die tuberkulöses Aussehen hatten und histologisch einen dem typischen Tuberkulum ähnlichen Bau aufwiesen.

Die Einimpfung der Tuberkelbazillen aus einer 8—10 Wochen alten Reinkultur erfolgte mit gewogener Oese und dem Davielschen Löffel in ähnlicher Weise wie oben. Der hierzu benutzte Stamm Eber war lange Zeit im Laboratorium fortgezüchtet und für Meerschweinchen erst in Mengen einer Normalöse, intraperitoneal nach 4 Wochen tödlich. Stamm 115 tötete Meerschweinchen intraperitoneal in Oesen von Tausend

Tuberkelbazillen intraperitoneal nach 4—5 Wochen. Irisimpfungen mit diesem Stamm bei Meerschweinchen ergaben progrediente Tuberkulose des Bulbus und der inneren Organe. Für die kleineren Infektionsquanten wurde eine Emulsion von Bakterien hergestellt, die im Mörser sorgfältig verrieben waren, und die Anzahl der Bazillen ausgezählt. Bei der Injektion mit der Pravazspritze in die vordere Kammer wurde zunächst eine geringe Menge Kammerwasser durch Einstich der Kanüle entleert, bis der Druck nachließ.

Mit geringen Verlusten muß trotzdem gerechnet werden; wir injizierten daher in jedem Falle 0,1 ccm mehr als die Injektionsmenge.

Kaninchen No. 17.

24. 6. 20. 1 mg (gewogene Oese) Tuberkulosekultur (Stamm Eber, 8 Wochen alt).
26. 6. 20. Fremdkörper-Iritis durch das eingebrachte Agar-Kulturmaterial, fibrinöse Exsudation.
30. 6. 20. Unverändert, Nachlassen der Entzündung.
3. 7. u. 7. 7. 20. Exsudation in die v. K. resorbiert sich.
19. 7. 20. Stat. id.
20. 7. 20. Im oberen Teil der Iris Knotenbildung, wahrscheinlich Tuberkulose.
30. 7. 20. Enukleation.
Pathologisch-anatomischer Befund: Zahlreiche knötchenförmige Nester epitheloider Zellen, zweifellos tuberkulösen Charakters.

Uebertragung:

30. 7. 20. Ein Teil der Iris übertragen auf neues

Kaninchen No. 21.

14. 8. 20. Starke Injektion.
20. 8. 20. Entzündung und Knötchenbildung.
1. 9. 20. Stat. id.
14. 9. 20. Durchbruch durch die ektatische Cornea mit Phthisis bulbi.
16. 9. 20. Enukleation.
Pathologisch-anatomischer Befund: In dem geschrumpften Bulbus kleine und größere Herde aus zerfallenen Leukozyten. Außerdem kleinere und umfangreiche Ansammlungen großer einkerniger Zellen. Dazwischen tuberkuloseverdächtige Ansammlungen.

Kaninchen No. 26.

15. 9. 20. 2 mg Tuberkelbazillen (Stamm Eber, 10 Wochen alte Agarkultur).
24. 9. 20. Unspezifische Iridocyclytis.
2. 10. 20. Geringe Trübung der Cornea, kein Eiter in v. K. Narbe gut verheilt.
11. 10. 20. Nicht spezifische Keratitis.
12. 10. 20. Entzündung zurückgegangen.

Kaninchen No. 35. Tuberkulosestamm 115.

8. 12. 20. 0,005 mg in l. V.-K. entsprechend 5 Millionen Bazillen in 0,1 ccm Emulsion.
14. 12. 20. Schwere Iridocyclitis, wahrscheinlich postoperative Infektion.
27. 12. 20. Keratitis. Iris nicht sichtbar.
10. 1. 21. Iritis.

Kaninchen No. 36. Tuberkulosestamm 115.

8. 12. 20. 0,005 mg in l. V.-K. = 5 Millionen Bazillen.
14. 12. 20. Keine Entzündung.
27. 12. 20. Iritis mit Hypopion, Resorption.
30. 12. 20. Enukleation.
Pathologisch-anatomischer Befund: Pseudotuberkulose. Ein Teil Iris auf Meerschweinchen No. 13 i.p. Lebt noch nach 6 Monaten.

I. Uebertragung: Kaninchen No. 45.

30. 12. 20. Ein Teil der Iris auf Kaninchen No. 45.
3. 1. 21. Cornea getrübt.
5. 1. 21. Eventuell Tuberkulose.
10. 1. 21. Keine Iritis.
21. 1. 21. Iridocyclitis, Keratitis, wahrscheinlich Tuberkulose.
22. 1. 21. Enukleation.
17. 2. 21. † Darmverschlingung, Organe intakt.
Pathologisch-anatomischer Befund: In der Iris finden sich mehrfach kleine Knötchen aus größeren epitheloiden Zellen und einem peripheren Rundzellenkranz.

II. Uebertragung: Kaninchen No. 53.

22. 1. 21. Teil der Iris von Kaninchen No. 45.
24. 1. 21. Trübung der Cornea.
29. 1. 21. Keine Iritis.
Pathologisch-anatomischer Befund: Entzündliche, aber keine für Tuberkulose sprechenden Veränderungen.

Die Impfungen der Kaninchenaugen mit Reinkulturen von Tuberkelbazillen Typus humanus verschiedener Virulenz erzielte demnach in den Fällen Kaninchen No. 17, 21, 45 Veränderungen, die von denen bei echter Tuberkulose nicht oder kaum zu unterscheiden waren.

Die nächste Versuchsreihe impften wir mit Tuberkelbazillen Reinkultur Typus bovinus, Inokulationstechnik am Auge wie oben.

Typus bovinus.

Kaninchen No. 39.

10. 12. 20. 8 Wochen alte Agarkultur. 0,5 mg in l. V. K.
17. 12. 20. Zirkumskripte Hyperämie an der Stelle des Impfeinstichs.
27. 12. 20. Keratitis eventuell tuberculosa.
29. 12. 20. Enukleation. Teil von Cornea auf Kaninchen No. 43.

Pathologisch-anatomischer Befund: knötchenartige Wucherungen ohne Riesenzellen oder Verkäsung.
Tier 39 geht am 17. 2. an Miliartuberkulose ein.

Kaninchen No. 43. 1. Uebertragung am 29. 12. 20.

3. 1. 21. Cornea getrübt.
5. 1. 21. Postoperative Infektion.
10. 1. 21. Entzündung geht zurück.
21. 1. 21. Subakute Entzündung des Augeninnern, Tuberkulose nicht ausgeschlossen.
22. 1. 21. Enukleation.
Pathologisch-anatomischer Befund: Tuberkulose der Iris. Teil von Iris auf Kaninchen No. 52.
Tier 43 geht am 12. 3. 21. an Miliartuberkulose ein.

Kaninchen No. 52. 2. Uebertragung am 22. 1. 21.

24. 1. 21. Starke Eiteransammlung in vorderer Kammer.
29. 1. 21. Entzündung, sicher tuberkulösen Ursprungs.
Tier 52 geht am 19. 4. 21. an Miliartuberkulose ein.

Kaninchen No. 40.

10. 12. 20. 0,25 mg in linke V.-K.
17. 12. 20. Hornhaut stark getrübt.
27. 12. 20. Keratitis, eventuell tuberculosa.
22. 12. 20. Enukleation. Teil von Cornea auf Kaninchen No. 44.
Pathologisch-anatomisch kein spezifischer Befund.
Tier geht am 30. 1. 21. an Miliartuberkulose ein.

Kaninchen No. 44. 1. Uebertragung am 29. 12. 21.

3. 1. 21. Cornea getrübt.
5. 1. 21. Postoperative Infektion.
10. 1. 21. Entzündung geht zurück.
21. 1. 21. Subakute Entzündung des Augeninnern. Tuberkulose nicht ausgeschlossen.
Pathologisch-anatomisch kein sicherer spezifischer Befund.
Tier 44 geht am 5. 2. 21. an Miliartuberkulose ein.

Kaninchen No. 41.

10. 12. 20. 0,005 mg in linke V.-K. injiziert.
17. 12. 20. Exsudation in die v. K.
27. 12. 20. bis 21. 1. 21. Normal.
21. 2. 21. Abgelaufene leichte Entzündung, nicht tuberkulös.
Tier 41 geht am 13. 6. 21. an disseminierter Tuberkulose der inneren Organe ein.
Tuberkelbazillen im Ausstrich der verkästen Lungenknoten.

Kaninchen No. 42.

10. 12. 20. 0,005 mg in linke V.-K. injiziert.
17. 12. 20. Iris starke Trübung.
27. 12. 20. Postoperative Infektion.
21. 2. 21. Panophthalmie, nicht tuberkulös.
Tier 42 geht am 2. 3. 21 an Miliartuberkulose ein.

Trotz der großen Empfänglichkeit des Versuchstieres für den Typus bovinus reagierten bei Impfung in die vordere Augenkammer von 7 Tieren nur 3—41 Proz. mit einer sicheren oder annähernd sicheren Tuberkulose des vorderen Augenabschnittes, trotz beträchtlicher Mengen der injizierten Tuberkelbazillen. Eine leichte Steigerung der Virulenz scheint bei der dritten Uebertragung vom infizierten Auge aufzutreten. Trotz des negativen Augenbefundes einiger Kaninchen gingen sämtliche in die vordere Augenkammer geimpften Tiere an einer generalisierten Tuberkulose der inneren Organe ein.

Säurefeste Bakterienimpfungen.

Schildkrötentuberkulose (Friedmann).

Kaninchen No. 9.

4. 3. 20. In linke Iris (= V.-K.) $^1/_2$ mg (mit gew. Oese eingebracht) von 6 Tage alter Friedmannkultur.
10. 3. 20. Wunde tadellos vernarbt, an Iris hauchförmige Trübung und Verdichtung, beginnendes Knötchen.
12. 3. 20. Chronische Iridocyclitis. Knötchenbildung an Einstichstelle. Keine Präzipitate, hintere Synechien.
17. 3. 20. Chronische Iridocyclitis. Irisprolaps, starke Hornhauttrübungen.
17. 4. 20. Hintere Synechien, kein Anhalt für Tuberkulose.
4. 6. 20. Sehr schwere tuberkulöse exsudative Iritis.
5. 6. 20. Enukleation.
Pathologisch-anatomischer Befund: An einzelnen Stellen Zellanhäufungen, sonst keine Zeichen von Tuberkulose.
Tier 9 überlebt.

Kaninchen No. 10.

4. 3. 20. In linke Iris 1 mg (gewogene Oese) einer 16-tägigen Friedmannkultur.
12. 3. 20. Deutliche Trübungen in vorderer Kammer, Trübungen auf der Iris, 2 miliare Knötchen auf derselben.
17. 3. 20. Starke Hyperämie der Iris, hintere Synechien, auf Iris gelbe Knötchen, nicht wie Tuberkulose aussehend, sondern wie chronisch verlaufende Iridocyclitis.
17. 4. 20. Synechien zwischen Pupillar- und Ciliarrand. Nahe dem Pupillarrand ein Bezirk auf dem ca. 10 perlenartige Knötchen sitzen, ohne sichtbare Vaskularisation.
Zahlreiche hintere Synechien.
Das Bild erinnert an Tuberkulose.
4. 6. 20. Beginnende Iritis (oder abgelaufene) nicht typisch für Tuberkulose.
20. 6. 20. Noch geringe Injektion der Iris.
Pathologisch-anatomischer Befund: Keine spezifisch tuberkulösen Veränderungen.
Tier 10 überlebt.

Kaninchen No. 11.

8. 6. 20. In linke Iris $^1/_2$ mg (gewogene Oese) einer 10-tägigen Friedmannkultur.
10. 6. 20. Tadellose Heilung, keine Eiterung.
16. 6. 20. Stat. id.
20. 6. 20. Keine entzündlichen Veränderungen, jedoch vordere Synechien Irisverletzung).
26. 6. 20. Stat. id.
19. 7. 20. Entzündung vollkommen zurückgegangen.
11. 9. 20. Abgelaufene Iritis, nicht spezifisch.
15. 9. 20. Enukleation.
Pathologisch-anatomischer Befund: Ohne besonderen Befund.
Tier 11 überlebt.

Kaninchen No. 12.

8. 6. 20. In linke Iris $^1/_2$ mg (gew. Oese) einer 8 Wochen alten Friedmannkultur.
10. 6. 20. Starke Trübung der Iris.
16. 6. 20. Iridocyclitis.
20. 6. 20. Spezifisch entzündliche Vorgänge nicht sicher nachweisbar.
26. 6. 20. Vorfall des Corpus ciliare. Iridocyclitis nicht spezifisch tuberkulös.
19. 7. 20. Sehr schwere Keratitis, nicht spezifisch.
23. 7. 20. Iritis zurückgegangen, nichts Spezifisches.
27. 7. 20. Enukleation.
Pathologisch-anatomischer Befund: Zahlreiche knötchenförmige Nester epitheloider Zellen, zweifellos tuberkulösen Charakters.
Tier 12 überlebt.

Kaninchen No. 18.

24. 6. 20. In linke Iris $^1/_2$ mg (gew. Oese) einer 7 Wochen alten Agarkultur.
26. 6. 20. Fibrinöse Iritis, mit tuberkulöser Entzündung?
30. 6. 20. Unverändert. Starke Vaskularisation der Hornhaut. Nachlassen der Entzündung.
3. 7. 20. Exsudat hat sich vollkommen resorbiert. Keine Knötchen. Tuberkulöse Entzündung fraglich.
7. 7. 20. Abgelaufene Iritis, nicht spezifisch.
19. 7. 20. Stat. id.
29. 7. 20. Stat. id.
11. 9. 20. Stat. id. Unspezifische abgelaufene Iritis.
24. 9. 20. Atrophie des Pigments, im übrigen derselbe Befund.
29. 9. 20. } 11. 12. 20. } Stat. id.
Tier 18 überlebt.

Kaninchen No. 19.

24. 6. 20. In linke Iris 1 mg (Oese) einer 7-wöchigen Agarkultur.
26. 6. 20. Knötchenbildung. Verdächtig auf Tuberkulose.
30. 6. 20. Unverändert, Nachlassen der Entzündung.
3. 7. 20. Exsudat fast vollkommen resorbiert. Tuberkulöse Entzündung fraglich.

7. 7. 20. Abgelaufene Iritis.
19. 7. 20. Beginnende Keratitis.
23. 7. 20. Partielle Irishyperämie. Eventuell beginnende tuberkulöse Entzündung.
29. 7. 20. Iridektomie.
11. 9. 20. Abgelaufene Iridocyclitis. Nicht spezifisch.
24. 9. 20. Befund unverändert.
Tier 19 überlebt.

Kaninchen No. 20.

24. 6. 20. In linke Iris 2 mg (Oese) einer 7-wöchigen Agarkultur.
26. 6. 20. Tuberkulöse Iritis.
30. 6. 20. Unverändert, Nachlassen der Entzündung.
3. 7. 20. Exsudat fast vollkommen resorbiert. Tuberkulöse Entzündung fraglich.
7. 7. 20. Abgelaufene Iritis.
19. 7. 20. Beginnende Kerato-Iritis.
23. 7. 29. Partielle Irishyperämie, eventuell Tuberkulose im Beginn.
28. 7. 20. Enukleation.
Pathologisch-anatomischer Befund: Zahlreiche knötchenförmige Nester epitheloider Zellen. Zweifellos tuberkulöser Prozeß.
Tier 20 überlebt.

Kaninchen No. 13.

22. 7. 20. In linke Iris (V.-K.) 1 mg (Oese) einer 14-tägigen Agarkultur
11. 9. 20. Abgelaufene Iritis, nichtspezifisch.
24. 9. 20. Stat. id.
10. 1. 21. Normal.
Tier 13 überlebt.

Kaninchen No. 28.

28. 9. 20. In linke Iris 2 mg Friedmannkultur 3 Wochen alt,
2. 10. 20. Irisprolaps.
12. 10. 20. Eitrige Entzündung.
29. 10. 20. Enukleation.
Pathologisch-anatomischer Befund: Nicht sicher tuberkulös (abszed. Stelle in der Hornhaut).
Tier 28 überlebt.

1. Uebertragung: Kaninchen No. 33.

29. 10. 20. Teil von Iris Kaninchen No. 28 in linke V.-K.
5. 11. 20. Kein Befund.
15. 11. 20. Vollständig reaktionslos eingeheilt.
25. 11. 20. Iridektomie.
29. 11. 20. Stat. id. Keine Entzündung, keine Iritis.
11. 12. 30. Desgl.
14. 12. 20. Desgl.
5. 1. 21. Normal.
10. 1. 21. Normal.
Tier 33 überlebt.

2. Uebertragung: Kaninchen No. 34.

25. 11. 20. Teil von Iris Kaninchen No. 33 in linke V.-K.
29. 11. 20. Iritis, nicht sichtbar, ob spezifisch.
8. 12. 20. Infektion zurückgegangen.
11. 12. 20. Stat. id. Keine Infektion mehr sichtbar.
14. 12. 20. Keine Iritis.
27. 12. 20. Reaktionslos.
5. 1. 21. Normal.
Tier 34 überlebt.

Kaninchen No. 29.

28. 9. 20. In linke V.-K. 4 mg Friedmannkultur 3 Wochen alt.
2. 10. 20. Geringe Trübung der Cornea, kein Eiter in vorderer Kammer Narbe gut verheilt.
11. 10. 20. Schwere exsudative Iritis, nicht spezifisch; wahrscheinlich postoperative Infektion.
12. 10. 20. Keratitis.
18. 10. 20. Postoperative, nicht spezifische Infektion.
2. 11. 20. Abklingen der Entzündung.
10. 11. 20. Auge normal.
Tier 29 überlebt.

Menschenapathogene Säurefeste.

Schildkrötenstamm Friedmann.

Dieselben Befunde, wie wir sie ab und zu bei den echten Tuberkelbazillen vom Typus humanus und Typus bovinus erheben konnten, können somit auch bei den übrigen Säurefesten festgestellt werden. Ungleichmäßiges Verhalten bei Impfung in das Kaninchenauge, ab und zu Veränderungen, welche von echten tuberkulösen Prozessen nicht zu unterscheiden sind. Eine Steigerung der Virulenz konnte nach zwei Uebertragungen (Kaninchen 28, 33, 34) nicht festgestellt werden.

Keine Abweichungen hiervon zeigten drei Impfungen mit dem „Chelonin-Stamm“ in das Kaninchenauge.

Chelonin-Stamm.

Kaninchen No. 37.

1 mg Bazillen verrieben, aufgenommen in 20 ccm NaCl.

8. 12. 20. Injiziert 0,1 der Suspension = 0,01 mg = 10 Mill. Bazillen.
14. 12. 20. Keine Entzündung.
27. 12. 20. Keratitis. Iris nicht sichtbar.
10. 1. 21. Eitrige Iritis (Operationsfolge).
21. 1. 21. Keine Tuberkulose.
29. 1. 21. Keine Iritis.
21. 2. 21. Abgelaufene Regenbogenhautentzündung nicht tuberkulös.
Tier 37 überlebt.

Kaninchen No. 38.

8. 12. 20. Injiziert 0,01 mg = 10 Millionen Bazillen.
14. 12. 20. Leichte Iritis.
27. 12. 20. Normal.
5. 1. 21. Normal.
10. 1. 21. Außer linkem Trauma normal.
21. 1. 21. Normal.
29. 1. 21. Keine Iritis.
21. 2. 21. Abgelaufene Regenbogenhaut. Entzündung, nicht tuberkulös Tier 38 überlebt.

Kaninchen No. 55.

Injiziert 0,1 mg einer 4 Wochen alten Kultur.
9. 2. 21. Entzündung der Iris, nicht tuberkulös.
21. 2. 21. Panophthalmie, nicht tuberkulös.
Tier 55 überlebt.

Impfungen in die Vorderkammer des Meerschweinchenauges führten wir folgende aus:

Meerschweinchen No. 18.

9. 12. 20. 0,5 mg einer 4 Tage alten Cheloninkultur Piorkowski injiziert.
11. 12. 20. Trübung der Cornea, Entzündung im übrigen gering.
27. 12. 20. Iritis fibrinosa, event. tuberculosa.
30. 12. 20. Enukleation, ein Teil der Iris auf Kaninchen No. 46, ein Teil auf Meerschweinchen No. 5, intraperitoneal.

Meerschweinchen No. 5.

30. 1. 21. †. Befund: Geschwollene Mesenterialdrüsen, Milz groß, wiegt 2,0. Schnitte ergeben säurefeste Bazillen in Milz, Tuberkeln mit Riesenzellen.
Beachtlich ist, daß an einer progredienten klassischen Tuberkulose das Tier Meerschweinchen No. 5 nicht einging, vielmehr eine der häufigen interkurrenten Stallseuchen mit Todesursache war.
Es ist von Kruse darauf hingewiesen worden, daß solche Veränderungen, in ähnlichem ursächlichen Zusammenhang, Tendenz zeigen, sich von selbst durch langsame Resorption rückzubilden, falls der auf die Impfung folgenden Reaktion dazu Zeit gelassen wird.
Kaninchen No. 46 zeigte nach einigen Tagen Trübung der Cornea, der Bulbus ging jedoch durch eine traumatische Vereiterung verloren.

Meerschweinchen No. 19.

9. 12. 20. 0,05 mg einer 4 Tage alten Cheloninkultur Piorkowski injiziert.
11. 12. 20. Trübung der Cornea.
17. 12. 20. Stat. id.
27. 12. 20. Iritis fibrinosa, event. tuberculosa.

30. 12. 20. Enukleation.
Pathologisch-anatomischer Befund: Keine tuberkulösen Veränderungen.

Säurefeste aus Milch und Gras.

Kaninchen No. 23.

2. 9. 20. 1 mg (Oese) in vordere Kammer eingebracht.
7. 9. 20. Unspezifische Iridocyclitis.
24. 9. 20. Stat. id.
11. 10. 20. Keratitis unspezifisch, Entzündung zurückgegangen.

Kaninchen No. 31.

28. 9. 20. 4 mg (Oese) in vordere Kammer eingebracht.
2. 10. 20. Trübung der Cornea, keine Eiteransammlung.
11. 10. 20. Iritis exsudativa.
12. 10. 20. Plastische Iridocyclitis, tuberkuloseverdächtig.
19. 10. 20. Enukleation, Teil auf Kaninchen 22 übertragen.
Pathologisch-anatomischer Befund: Kein tuberkulöser Prozeß.

Kaninchen No. 22.

19. 10. 20. Erhält einen Teil der Iris von Kaninchen No. 31 in linke vordere Kammer.
26. 10. 20. Trübung der Cornea, Iris nicht deutlich verändert.
29. 11. 20. Reizlos, keine Entzündung.

Kaninchen No. 24.

2. 9. 20. Erhält 1 mg (Oese) vom Stamm „Thimotee“ in vordere Kammer.
7. 9. 20. Unspezifische Iridocyclitis.
24. 9. 20. Stat. id.
11. 10. 20. Unspezifische Keratitis, keine Entzündung.

Zusammenfassung.

1) Eine scharfe Differenzierung der verschiedenen Säurefesten auch durch Impfungen am Auge ist nicht möglich.

2) Auch menschenapathogene Säurefeste können mitunter Veränderungen an der Iris setzen, die weder klinisch noch anatomisch-pathologisch von echten tuberkulösen Prozessen zu unterscheiden sind.

3) Durch Wiederimpfung von Auge zu Auge beim Kaninchen ließ sich in unseren Fällen keine oder kaum merkliche Steigerung der Virulenz konstatieren.

4) Tuberkelbazillen vom Typus bovinus unterscheiden sich nicht von den übrigen. Einziger Unterschied ist, daß sie schließlich beim augegeimpften Kaninchen eine generalisierte Tuberkulose setzen.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena. — 4975

Zeitschrift f. Immunitätsforschung. Originale. Bd. 33. Heft 6.

[Aus dem Institut zur Erforschung der Infektionskrankheiten in Bern (Direktor: Prof. Dr. G. Sobernheim).]

Untersuchungen über das Vorkommen virulizider Stoffe im Blute vakzinierter und revakzinierter Menschen.

Von Dr. **S. Fujii.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 10. September 1921.)

Die Tatsache, daß eine erfolgreiche Vakzinierung gegen Vakzine- bzw. Variolavirus schützt, ist schon lange bekannt, denn auf dieser Kenntnis beruht ja die Einführung der Vakzination durch Jenner. Das Wesen dieser Immunität aber ist bis heute noch nicht aufgeklärt, trotz der zahlreichen Untersuchungen, die sich damit beschäftigt haben. Der Nachweis von Antikörpern im Serum geimpfter Menschen und Tiere und von Pockenrekonvaleszenten stieß auf Schwierigkeiten und die Ergebnisse waren ungleichmäßig (vgl. hierzu die zusammenfassende Darstellung von K. Sato), so daß die von v. Prowazek begründete Theorie, es handle sich um eine Gewebsimmunität, zahlreiche Anhänger fand.

v. Prowazek stützte sich bei dieser Auffassung wesentlich auf Versuche, die eine Sonderstellung der Cornea bei der Vakzineimmunität zu erweisen schienen, insofern, als Kaninchen, die nach Ablauf einer kutanen Impfung hautimmun waren, sich an der Cornea noch mit Erfolg impfen ließen und umgekehrt; auch sollte die Immunität nicht von einer Cornea auf die andere übergehen. Diese Stütze der Theorie einer Gewebsimmunität ist aber späterhin stark erschüttert worden; neuere Untersuchungen, insbesondere von Gins und von Sato, haben gezeigt, daß die Cornea an der allgemeinen Immunität wohl teilnimmt, wenn auch in abgeschwächter und verzögerter Weise; soweit eine Sonderstellung der Cornea besteht, würde sie einer humoralen Immunität nicht widersprechen, sondern in den besonderen Verhältnissen der mangelhaften Blutversorgung der Hornhaut ihre Erklärung finden. Daher beschränkt sich auch die abgeschwächte und verzögerte Teilnahme der Cornea an der allgemeinen Immunität nicht nur auf die Vakzine; Doerr und Vöchting haben ein ganz analoges Verhalten bei der Herpes-Immunität festgestellt. Fernerhin spricht auch

die Tatsache, daß sich durch subkutane und intravenöse Vorbehandlung, ohne Hautaffektion, beim Kaninchen eine allgemeine Immunität, unter Umständen einschließlich der Cornea, erzielen läßt (Süpfle und Eisner, Gins, Sato u. a.), eher für eine humorale als für eine Gewebsimmunität, und ausschlaggebend ist schließlich, daß bei dem vakzineimmunen Tier tatsächlich spezifische Blutveränderungen mit Sicherheit nachweisbar sind.

Präzipitation, Komplementbindung und passive Immunisierung freilich gaben, wie eingangs erwähnt, unsichere Resultate; entscheidende Aufklärung jedoch brachte der 1892 von Sternberg eingeführte und weiterhin von zahlreichen Autoren (Literatur in der neuen, aus dem hiesigen Institut veröffentlichten Arbeit von K. Sato) angewendete „virulizide Versuch“, der, kurz gesagt, darin besteht, daß man Vakzine mit dem zu prüfenden Serum mischt und nach genügender Einwirkung auf ein empfängliches Tier verimpft; hatte das Serum virulizide Stoffe enthalten, so bleibt die Impfung mehr oder weniger erfolglos. Mittels dieser Methode sind am Tier vielfache Untersuchungen ausgeführt worden, am eingehendsten von Gins und von Sato, und es kann danach keinem Zweifel mehr unterliegen, daß die Vakzineimmunität des Kaninchens mit der Bildung virulizider Stoffe im Serum einhergeht. Sato hat auch bei der Korneaimmunität des Kaninchens solche Stoffe im Serum nachgewiesen. Die virulizide Kraft des Serums dient als Indikator, der uns einen humoralen Anteil der Immunität anzeigt, ohne freilich die Gesamtheit des Immunitätsphänomens für sich allein erklären zu können, eine Unklarkeit, der wir ebenso bei der Immunität gegen Typhus und andere Infektionskrankheiten begegnen: hier wie dort besteht die Immunität fort, auch wenn im Serum keine Antikörper mehr nachweisbar sind.

Immerhin ergab sich die Möglichkeit, mittels des viruliziden Versuches über gewisse Besonderheiten der Vakzineimmunität Aufschluß zu gewinnen. So hat Sato beim Kaninchen den Einfluß erneuter Vakzination auf eine bestehende Vakzineimmunität geprüft und festgestellt, daß auch die ohne sichtbare Hautreaktion verlaufende Wiederimpfung die virulizide Kraft des Serums erheblich steigert.

Die Frage ist noch offen, wie sich die Revakzination des Menschen in ihren verschiedenen Reaktionsformen serologisch äußert, wie denn überhaupt Untersuchungen über virulizide Substanzen beim Menschen noch nicht sehr zahlreich sind. Hat doch noch 1916 Gins geschrieben, es seien Versuche eingeleitet zum „Nachweis der antivirulenten Substanzen beim normalen, vakzinierten und von der Pockenkrankheit genesenen Menschen“, ein Zeichen, daß damals noch nicht viel Sicheres bekannt war.

Einige Angaben freilich liegen bereits vor. Béclère, Chambon und Ménard (1899) haben das zu untersuchende Serum unverdünnt mit

Vakzinepulpa gemischt, unter wiederholtem Umschütteln 48 Stunden bei Zimmertemperatur belassen, das Serum abgehoben und dann die Pulpa in der gewöhnlichen Weise durch Schnittimpfung an Rindern geprüft, mit Pulpa gleicher Lieferung in normalem Rinderserum als Kontrolle. Sie haben auf diese Weise Sera von 19 vakzinierten Menschen untersucht, geben aber nur einen Versuch ausführlicher an: 44-jährige Frau, in der Kindheit einmal geimpft; Serum im viruliziden Versuch unwirksam, 32 Tage nach erfolgreicher Revakzination stark virulizid. Ferner erwies sich in einem zweiten Fall das Serum 12 Tage nach erfolgreicher Wiederimpfung als deutlich antivirulent, in einem dritten Fall 6 Tage nach erfolgreicher Revakzination unwirksam, 14 Tage nach der Impfung schwach antivirulent. Weiterhin haben die Autoren das Serum von 10 Pockenkranken bzw. Rekonvaleszenten und von 3 Personen untersucht, die vor mehreren Jahrzehnten Pocken durchgemacht hatten. Auch hier sind nicht sämtliche Ergebnisse mitgeteilt: bei 3 Personen war das Serum am 20., 21. bzw. 27. Tage nach Erscheinen des Exanthems stark antivirulent, schwächer bei einer Person am 11. Tage, sehr schwach, aber deutlich antivirulent bei 2 Personen am 4. bzw. 6. Tage. Ein Mann, der vor 26 Jahren Pocken durchgemacht hatte und sich gegen Vakzine als immun erwies, hatte ein schwach antivirulentes Serum, ein anderer, 38 Jahre nach Ueberstehen von Variola, war ebenfalls nicht mit Erfolg impfbar, aber sein Serum war unwirksam, bei einem dritten, der vor 56 Jahren Pocken gehabt hatte, war ebenfalls das vor der Impfung entnommene Serum gar nicht antivirulent, und er konnte, wenn auch nicht mit vollem Erfolg, geimpft werden.

Martius (1900) arbeitete fast mit der gleichen Methodik, verwendete aber nicht Pulpa, sondern verriebene Glyzerinlymphe; seine Zahlen sind außergewöhnlich klein. Im Serum von Menschen, bei denen die Impfung 20 Jahre und länger zurück lag, konnte er virulizide Substanzen nicht nachweisen, das Serum eines Mannes dagegen, der als Sohn eines Impfarztes sehr häufig, und zwar ohne Erfolg, und zuletzt 3 Jahre vor der Blutentnahme mit Entwicklung eines sehr rudimentären Bläschens geimpft worden war, hob die Wirkung der Lymphe fast völlig auf. Auch das Serum eines Menschen, 14 Tage nach Ausbruch echter Variola entnommen, erwies sich als stark virulizid.

In etwas anderer Weise gingen v. Prowazek und de Beaurepaire Aragão (1909) vor: sie vermischten Serum von Pockenrekonvaleszenten mit gleichen Mengen Inhalts aus möglichst jungen Variolapusteln, beließen das Gemisch unter wiederholtem Durchschütteln 20—24 Stunden im Eisschrank, verimpften es dann auf die Kaninchenkornea und beurteilten den Erfolg nach dem Auftreten von Guarnierischen Körperchen. Sie untersuchten Serum 12, 14, 15, 20, 24 und 30 Tage nach Abheilen der Pusteln, und obwohl die Versuchsbedingungen verhältnismäßig milde waren (Variola erzeugt auf der Kaninchenkornea weniger stürmische Erscheinungen, als Vakzine), konnten sie höchstens doch nur eine Abschwächung, keine völlige Abtötung des Virus konstatieren und sagen, „das Variolaserum . . . zeichnet sich im allgemeinen durch einen Mangel an Antikörpern aus“.

Teissier und Gastinel fernerhin haben 1912 Folgerungen aus ihren Untersuchungen veröffentlicht, ohne Mitteilung der Versuchsanordnung oder weiterer Einzelheiten. In Bezug auf die Dauer der Virulizidie nach Vakzination sagen sie, „man wisse, daß sie beim Menschen nach Jahren zählt". Wenn man bei Wiederimpflingen die Serumreaktionen und den Impferfolg vergleiche, so stelle es sich heraus, daß die v. Pirquetsche Frühreaktion nur bei denjenigen Personen auftritt, deren Serum virulizid wirkt, und bei denjenigen fehlt, deren Serum Komplementbindung gibt; die Komplementbindung entspreche dem Zustand einer, wenn auch latenten, Infektion, die Virulizidie einem Immunitätszustand. Die Frühreaktion zeige also nicht nur Allergie an, sondern auch einen noch bestehenden Impfschutz (vgl. auch Gastinel).

Gins schließlich gibt an, beim frisch geimpften Menschen kämen regelmäßig virulizide Stoffe vor.

Hiernach und mit Rücksicht auf Satos beim Kaninchen erzielte Ergebnisse mußte es als aussichtsreich erscheinen, mittels des viruliziden Versuchs die mit dieser Methode systematisch noch nicht bearbeitete Frage zu prüfen, welcher Wiederimpfungserfolg nötig ist, um den Impfschutz zu erneuern bzw. zu steigern, eine praktisch wichtige Frage, die neuerdings mehrfach erörtert worden ist und über deren Stand Sobernheim in jüngster Zeit kurz berichtet hat. Daß eine Revakzination mit typischer Pustelbildung Immunität erzeugt, wird wohl nicht bezweifelt, und schon die alten Untersuchungen von Béclère, Chambon und Ménard zeigten, daß danach im Serum virulizide Stoffe auftreten; ob aber die Revakzination ohne Hautreaktion oder nur mit Frühreaktion, Rötung, Papelbildung u. dgl. ebenfalls zur Immunitätssteigerung führt, wird z. B. von Paul und Gins bezweifelt, während Paschen auch hier eine Wirkung auf die Immunität annimmt.

Im folgenden möchte ich daher über eine Reihe von Untersuchungen berichten, die ich auf Veranlassung von Herrn Prof. Sobernheim an Menschen vorgenommen habe, um den Einfluß der Vakzination und Revakzination auf die Virulizidie ihres Serums zu ermitteln. Die Zahl der Versuchspersonen ist nur eine verhältnismäßig geringe, doch boten sie nach der Art ihres Impfzustandes und dem Grade des Pockenschutzes weitgehende Verschiedenheiten, so daß immerhin gewisse Schlußfolgerungen aus den Ergebnissen gezogen werden können.

Im ganzen wurden 15 Personen zu den Versuchen herangezogen. Die meisten von ihnen, nämlich 10, waren im 1. und 13. Lebensjahre in der üblichen Weise geimpft und wiedergeimpft worden, hatten sich außerdem zum Teil noch im späteren Lebensalter bei verschiedenen Gelegenheiten impfen lassen und wurden dann während des Krieges mindestens einmal, einige mehrmals von neuem geimpft. Einer von diesen 10 hatte überdies vor 9 Jahren eine fieberhafte Erkrankung mit pustulösem Exanthem durchgemacht, die als Variolois gedeutet worden war. Unter den übrigen (5) Versuchspersonen befand sich nur noch eine, die früher geimpft worden war, und zwar ein einziges Mal, vor 19 Jahren, während die 4 anderen sich niemals in ihrem Leben einer Impfung unterzogen hatten. Im Laufe meiner Versuche ließ sich einer von diesen letzteren impfen.

Alle Geimpften, deren Blut zur Untersuchung gelangte, waren Mediziner, so daß die Angaben über ihre früheren Impfungen und Impfreaktionen als zuverlässig angesehen werden dürfen.

Der Gang der Untersuchungen gestaltete sich so, daß zunächst von allen eine Blutprobe genommen und auf viruIizide Kraft des Serums geprüft wurde. Dann wurden mit Ausnahme von 3 Ungeimpften, die sich auch weiterhin einer Impfung widersetzten, sämtliche Versuchspersonen von neuem geimpft. Zur Impfung diente die sehr wirksame Lymphe des Schweiz. Serum- und Impfinstituts. Jeder erhielt 4 Impfschnitte, nach der bekannten und bewährten Technik. Die Reaktion fiel hierbei, wie wir später sehen werden, sehr verschieden aus. Nach ca. 3 Wochen wurden dann abermals Blutproben zwecks Anstellung des viruliziden Versuchs entnommen. In einigen Fällen wurde die Blutentnahme nach der Impfung mehrmals wiederholt, um das Verhalten der viruliziden Serumwirkung über einen größeren Zeitraum zu verfolgen. In einem Falle (Selbstversuch) wurde $2^1/_2$ Monate nach der ersten Neuimpfung eine zweite Nachimpfung vorgenommen und das Serum auch hiernach fortlaufend auf Virulizidie kontrolliert.

Die Technik des viruliziden Versuchs kann in verschiedener Weise gehandhabt werden. Die Hauptschwierigkeit liegt darin, daß die Virulenz der Lymphe gewöhnlich nicht so

genau bestimmt und berücksichtigt werden kann, wie es eigentlich erforderlich ist und wie es z. B. bei der Prüfung eines Serums auf bakteriolytische Kraft im Pfeifferschen Versuch durch exakte Dosierung des bakteriellen Virus möglich ist. Unter den Methoden, die für diesen Zweck herangezogen worden sind, scheint sich das neuerdings von Groth empfohlene Verfahren zu bewähren; wenigstens äußern sich Haendel, Gildemeister und Schmitt über die hiermit erhaltenen Resultate günstig. Wir haben auf die Anwendung dieser Methode, die bekanntlich darin besteht, daß die Lymphe in fallenden Verdünnungen Kaninchen intrakutan injiziert und so die geringste noch reaktionsauslösend wirkende Dosis ermittelt wird, verzichten zu können geglaubt. Es kam uns in erster Linie darauf an, ein Virus von konstanter Virulenz in Händen zu haben, das uns gestattete, die zu verschiedenen Zeiten mit verschiedenen Serumproben gewonnenen Ergebnisse untereinander zu vergleichen. Durch Verwendung einer solchen Lymphe ist es möglich, die virulizide Kraft eines Serums einigermaßen kennen zu lernen und mit praktisch ausreichender Genauigkeit gegen diejenige anderer Sera abzuschätzen, auch ohne daß die Infektiosität der Lymphe bis zur Titergrenze ausgewertet ist. Die Prüfung des Serums in einer Reihe von Verdünnungen gibt dabei ausreichende Anhaltspunkte.

Hinsichtlich aller weiterer technischer Einzelheiten habe ich mich an das Vorgehen von Gins gehalten, das auch von K. Sato zu seinen umfassenden Untersuchungen herangezogen und bewährt gefunden worden ist. Als Virus diente eine ca. 6 Wochen alte Glyzerinlymphe. Um ein möglichst homogenes Ausgangsmaterial zur Verfügung zu haben und alle gröberen Partikelchen aus der Lymphe zu beseitigen, wurde die Lymphe zunächst durch Zentrifugieren (ca. 20 Minuten) geklärt. Ich habe mich also nicht auf einfaches Sedimentieren beschränkt, obwohl auch dieses Verfahren nach den Beobachtungen von Sato eine genügende Sicherheit gewährt, sondern habe nach dem Vorschlage von Gins scharf zentrifugiert. Die Lymphe ist hierdurch wahrscheinlich in ihrer Wirksamkeit noch etwas mehr herabgesetzt worden, als durch Sedimentierung, was schon hier im Hinblick auf die bei meinen

Versuchen erhaltenen Resultate hervorgehoben sei. Nach dem Zentrifugieren wurde von dem Bodensatz vorsichtig abpipettiert und die homogene Lymphe mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Im allgemeinen gelangte eine Lympheverdünnung von 1 : 50 zur Anwendung, die nach den Feststellungen von Gins und Sato sowie nach meinen eigenen Beobachtungen sich für den viruliziden Versuch am besten eignet. In einigen Fällen wurde außerdem noch eine stärkere Verdünnung von 1 : 200 mit herangezogen, ohne daß aber hierdurch eine wesentliche Aenderung der Resultate erzielt werden konnte. Dieses Testmaterial wurde zu jedem Versuche aus unserer im Eisschrank aufbewahrten Stammlymphe frisch hergestellt.

Das Serum gelangte stets so schnell wie möglich in aktivem Zustande zur Verarbeitung. Meist wurden die Sera am Tage der Blutentnahme oder tags darauf untersucht, nur ausnahmsweise mußten sie aus äußeren Gründen etwas länger aufbewahrt werden, ohne daß wir hierdurch die Wirksamkeit der Sera irgendwie beeinflußt gefunden hätten. Das zu prüfende Serum wurde in verschiedenen Verdünnungen und, wo es angezeigt schien, auch unverdünnt mit der Lymphe gemischt und gewisse Zeit in Berührung gelassen. Das geschah in der Weise, daß immer 0,2 ccm des Serums bzw. der Serumverdünnung mit 0,2 ccm der 1 : 50 (1 : 200) verdünnten Lymphe sorgfältig vermischt wurde, worauf die Mischung für 2 Stunden im Brutschrank bei 37° verblieb. Alsdann erfolgte Verimpfung des Gemisches auf die Kaninchenkornea. Die gleichmäßigen Versuchsreihen, die im allgemeinen bei den Tieren erhalten wurden, zeigen, daß durch diese Art des Vorgehens eine genügend sichere Einwirkung des Serums auf das Virus gewährleistet war.

Vor der Impfung wurde die Kornea des Kaninchens zuerst mit ca. 5 Tröpfchen einer 5-proz. Kokainlösung anästhesiert. Nach 10 Minuten habe ich dann die Kornea mit der scharfen Spitze einer Spritzenkanüle flach, gitterförmig geritzt und zu diesem Zweck immer 30 Schnitte, je 15 senkrecht zueinander angelegt. In die so vorbereitete Hornhaut wurde dann das Material der Serum-Lymphemischung mittels Platinöse sorgfältig eingetragen.

Der Verlauf der Impfung, der täglich genau kontrolliert

wurde, war je nach der Wirksamkeit des Serums ein verschiedener. Die typische Wirkung einer in ihrer Virulenz unbeeinflußten Lymphe auf die Kaninchenkornea ist bekannt und oft genug beschrieben, so daß ich über alle Einzelheiten nicht zu berichten brauche (vgl. Süpfle, Grüter, Gins, Sato u. v. a.). Ich verweise insbesondere auf die Angaben von Sato; ich habe hinsichtlich des Grades der Reaktion auch die von ihm aufgestellten Kriterien für die tabellarische Zusammenstellung meiner Untersuchungsergebnisse verwertet.

Zu jeder Versuchsreihe wurden natürlich Kontrollen herangezogen, weil trotz aller Vorsichtsmaßregeln und trotz gewissenhaftester Einhaltung einer stets gleichmäßigen Technik gewisse Schwankungen der Reaktionsstärke unvermeidlich sind. Diese Kontrollversuche bestanden darin, daß die Lymphe genau in der gleichen Weise wie mit dem zu prüfenden Serum auch mit physiologischer Kochsalzlösung oder mit normalem Kaninchenserum oder mit normalem menschlichen Serum, d. h. mit dem Serum niemals geimpfter Personen vermischt wurde. Die Verimpfung auf die Kaninchenkornea erfolgte dann so, daß entweder ein Tier als Kontrolltier blieb und an beiden Augen mit der Kontrollmischung geimpft wurde oder aber, daß eine Kornea zu dem viruliziden Versuch, die andere zur Kontrollimpfung benutzt wurde. In den einzelnen Versuchen und Versuchsreihen ließ sich daher immer ein ziemlich sicheres Urteil über die spezifische Virulizidie der Blutproben gewinnen.

Zunächst sei auf die Kontrollversuche mit einigen Worten eingegangen. In Tabelle I sind die Ergebnisse zusammengestellt. Es geht daraus hervor, daß das Serum der 4 ungeimpften Personen niemals eine irgendwie nennenswerte virulizide Kraft besessen hat. Das Blut von zweien wurde wiederholt geprüft, sowohl gegenüber der $^1/_{50}$ als auch gegenüber der $^1/_{200}$ verdünnten Lymphe. Selbst in konzentrierter Form vermochte das Serum nicht das Virus abzutöten, höchstens eine ganz geringe Abschwächung der Vakzinewirkung hervorzurufen. Die mit normalem menschlichen Serum vermischte Lymphe erzeugte auf der Kaninchenkornea genau die gleichen Veränderungen, wie die einfach mit Kochsalzlösung oder mit normalem Kaninchenserum vermischte

Tabelle I.

Wirkung des **normalen** Menschenserums auf die Virulenz der Vakzine. (Virulizider Versuch; Kaninchenkornea.)

Serum			Vakzine. Verdünnung der Lymphe	Resultat	Bemerkungen
Herkunft	Datum	Verdünnung			
Schn.	1.IV.21	1/1	1/50	++++[1]	Keine virulizide Wirkung
„	dgl.	1/10	1/50	++++	
K.	18.IV.21	1/1	1/50	+++	dgl.
	dgl.	1/20	1/50	++++	
„	1. V. 21	1/1	1/50	++	Virulizide Wirkung angedeutet
	dgl.	1/20	1/50	+++	
„	14.VI.21	1/1	1/200	++	
	dgl.	1/10	1/200	++++	
„	21.VI.21	1/5	1/200	++++	Keine Wirkung
	dgl.	1/10	1/200	++++	
„	28.VI.21	1/10	1/50	++++	
	dgl.	1/10	1/200	+++	
R.	25. V. 21	1/1	1/50	++	Virulizide Wirkung angedeutet
	dgl.	1/10	1/50	++++	
„	9.VI.21	1/10	1/50	++	
„	14.VI.21	1/20	1/200	+++	Keine Wirkung
	dgl.	1/50	1/200	+++	
Kf.	13.IV.21	1/1	1/50	+++	dgl.
	dgl.	1/20	1/50	++++	
Normal.	5.III.21	1/1	1/50	+++	dgl.
Kaninchen	12.III.21	1/1	1/50	+++	
Physiol.	5.III.21	1/1	1/50	+++	dgl.
Kochsalzlös.	12.III.21	1/1	1/50	++++	
„	22.III.21	1/1	1/50	++++	
„	9.VI.21	1/1	1/400	—	Verdünnung der Lymphe unwirksam

1) Die Reaktionsstärke ist in folgender Weise verzeichnet (cf. K. Sato, l. c.):

— = negativ; keine nennenswerten Symptome;

\+ = schwach positiv; ganz kleines Geschwür oder Fazetten; geringe Trübung, schwache konjunktivale und perikorneale Injektion;

++ = mäßig stark positiv; etwas größere Geschwüre, an den Geschwüren lokalisierte stärkere oder mäßige Trübung, starke Injektion, vermehrte Sekretion;

+++ = stark positiv; ausgedehnte Geschwüre, diffuse starke oder mäßige Trübung, starke Injektion, vermehrte fibrinös-eiterige Sekretion;

++++ = sehr stark positiv; Reaktion ungewöhnlich intensiv und sehr lange andauernd.

Kontrollymphe. Die Erwartung, daß mit stärkerer Verdünnung der Lymphe ($^1/_{200}$) sich virulizide Einflüsse vielleicht deutlicher bemerkbar machen würden, hat sich nicht bestätigt. Noch weiter zu gehen mit der Verdünnung der Lymphe war nicht möglich, da, wie der letzte Versuch zeigte, eine Verdünnung von $^1/_{400}$ auch in der Kontrolle nicht mehr wirkte. Schon die Verdünnung $^1/_{200}$ war, wie früher erwähnt und aus der folgenden Tabelle III hervorgeht, in der Wirkung ungleichmäßig und bot im Vergleich mit der gewöhnlich verwendeten Lympheverdünnung $^1/_{50}$ keine Vorzüge.

Die Versuche mit dem Serum vakzinierter und revakzinierter Personen bieten in verschiedener Hinsicht Interesse (cf. Tabelle II). Zunächst dadurch, daß alle 7 Sera von vornherein gar keine oder nur eine sehr schwache virulizide Wirkung äußerten, obwohl sie sämtlich von Menschen stammten, die infolge wiederholter Impfungen einen Zustand hohen Pockenschutzes erworben haben mußten. Alle waren in den Kriegsjahren oder noch später wiedergeimpft worden, zuletzt vor 1—4 Jahren, und alle hatten die letzte Impfung reaktionslos bzw. mit leichter Frühreaktion (Fall L.) überstanden. Die Sera wurden unverdünnt und in der Verdünnung $^1/_{20}$ geprüft. In keinem Falle vermochte das unverdünnte Serum das Vakzinevirus völlig abzutöten; nur bei 2 Personen (S. und Mar.) war die virulizide Kraft so stark, daß die spezifische Korneareaktion des Kaninchens noch gerade zustande kam, und in 2 weiteren Fällen rief die Korneaimpfung ebenfalls eine abgeschwächte Reaktion hervor (N. und Sa.). Die 3 übrigen Sera dagegen verhielten sich selbst in konzentrierter Form fast genau wie normale menschliche Sera und waren so gut wie unwirksam (L., M. I und M. II). Bei Verdünnung der Sera ($^1/_{20}$) machte sich ein virulizider Einfluß überhaupt nicht mehr bemerkbar, so daß jedenfalls von einer nennenswerten antivirulenten Kraft der 7 in Tabelle II aufgeführten Sera keine Rede sein kann. Es besteht hier also kein Zusammenhang zwischen Vakzineimmunität und spezifischen Blutveränderungen, wie man ihn z. B. bei dem vakzineimmunisierten Kaninchen innerhalb gewisser Grenzen nachzuweisen vermag (Gins, Sato). Trotz der bei ihnen anzunehmenden hohen Pockenimmunität lieferten nur einzelne Versuchspersonen ein

Tabelle II.

Wirkung des Serums **vakzinierter** und **revakzinierter** Menschen auf die Virulenz der Vakzine.
(Virulizierter Versuch; Kaninchenkornea.)

No.	Name	Frühere Impfungen	Datum der Blutentnahme	Viruluzider Versuch [1])	Impfung. Datum und Reaktion	Datum der Blutentnahme	Viruluzider Versuch [1])	Bemerkungen
1	L.	Wiederholt geimpft, zuletzt 1917, Reaktion m. kl. Bläschen	4. III. 21	$^1/_1$ = ++ $^1/_{20}$ = +++	12. III. 21 Schwache, aber deutliche Frühreaktion	1. IV. 21	$^1/_5$ = + $^1/_{20}$ = ++ $^1/_{50}$ = ++	Durch Neuimpfung ist die virulizide Serumwirkung vielleicht um ein geringes verstärkt.
2	N.	Wiederholt geimpft, zuletzt 1918, reaktionslos	4. III. 21	$^1/_1$ = + $^1/_{20}$ = ++	12. III. 21 1 Schnitt fast reaktionslos, an den 3 anderen Pusteln, mit abortivem Verlauf	1. IV. 21	$^1/_5$ = ∓ $^1/_{20}$ = ++++ $^1/_{50}$ = ++++	Virulizide Kraft d. Serums nach der Neuimpfung kaum verstärkt
3	S.	Wiederholt geimpft, zuletzt 1917, ohne Reaktion	11. III. 21	$^1/_1$ = ∓ $^1/_{20}$ = ++	12. III. 21 Starke Frühreaktion; Schwellung. Rötung der Impfstelle, Juckgefühl	31. III. 21	$^1/_5$ = — $^1/_{20}$ = ++++ $^1/_{50}$ = ++++	dgl.
4	Sa.	dgl.	11. III. 21	$^1/_1$ = + $^1/_{20}$ = ++++	15. III. 21 Frühreaktion mit 1 Bläschen	5. IV. 21	$^1/_5$ = + $^1/_{20}$ = +++ $^1/_{50}$ = ++++	Keine deutliche Wirkung
5	M. I	Zuletzt vor 1 Jahre geimpft; Verlauf reaktionslos	16. III. 21	$^1/_1$ = ++ $^1/_{20}$ = ++	16. III. 21 Leichte Frühreaktion, ohne Bläschen oder Papeln	15. IV. 21	$^1/_5$ = + $^1/_{20}$ = ++ $^1/_{50}$ = +++	dgl.
6	M. II	Zuletzt vor 1 Jahre geimpft; keine Reaktion	16. III. 21	$^1/_1$ = ++ $^1/_{20}$ = +++	16. III. 21 Stärkere Frühreaktion mit Papelbildung (1 Papel)	—	—	Die Bluntuntersuch. nach der Impfung konnte aus äußeren Gründen nicht vorgenommen werden
7	Mar.	Zuletzt vor 3 Jahren; Verlauf negativ	24. III. 21	$^1/_1$ = ∓ $^1/_{20}$ = +++	24. III. 21 Keine Reaktion	14. IV. 21	$^1/_{20}$ = ++ $^1/_{50}$ = +++	Virulizide Serumwirkung nach der Neuimpfung nicht verstärkt

1) Lymphe stets $^1/_{50}$ verdünnt.

Serum, bei dem eine Andeutung von Virulizidie vorlag, die übrigen Sera enthielten virulizide Stoffe überhaupt nicht.

Bemerkenswert war nun der Verlauf der jetzt von neuem bei allen Versuchspersonen wieder vorgenommenen Vakzination. Die früheren Impfungen und Wiederimpfungen, auch die letzte reaktionslose Impfung, waren zu verschiedenen Zeiten, in verschiedenen Ländern (Deutschland, Schweiz, Japan), mit verschiedenen Lymphesorten und mit verschiedener Technik ausgeführt worden. Es konnte also sehr wohl möglich sein, daß — abgesehen von individuellen Momenten — die Immunität der einzelnen Personen sich doch nach ihrer Stärke unterschied, insbesondere konnte das Ausbleiben jeder Reaktion nach der letzten Impfung möglicherweise auch mit der Art der Impfung und mit der verwendeten Lymphe zusammenhängen. Die neue Impfung, die bei allen mit der gleichen Lymphe und mit gleicher Technik vorgenommen wurde, mußte diese Einflüsse ausschalten und aus dem Ausfall der Reaktion einen unmittelbaren Rückschluß auf den Grad der Immunität gestatten. Dabei zeigte sich nun, daß 1 Fall (N.) fast wie ein Erstimpfling mit Pustelbildung reagierte, nur daß der Verlauf etwas abgekürzt war. Hier lag also nur noch eine recht geringe Immunität vor und, wenn man nicht annehmen will, daß die 3 Jahre vorher reaktionslos gebliebene Impfung durch eine damals noch vollkommene Immunität bedingt war, so würde man wohl vermuten dürfen, daß für jene Impfung eine weniger virulente Lymphe verwendet worden ist. Es ist von Interesse, daß gerade in diesem Falle von unzulänglicher Immunität das Serum (vor der Neuimpfung) eine antivirulente Wirkung zu erkennen gegeben hatte. 3 weitere Fälle reagierten auf die Neuimpfung mit ausgesprochener Frühreaktion, zum Teil mit Papel- und Bläschenbildung (S., Sa., M. II), in den 3 übrigen Fällen blieb jede Reaktion aus oder sie äußerte sich nur in schwacher Frühreaktion ohne Papeln und Bläschen (L., M. I, Mar.). Die mehr oder minder starke Immunität, die hierdurch erwiesen war, konnte jedoch aus der vorher angestellten Serumprüfung nicht entnommen werden: Der virulizide Versuch war teils negativ, teils schwach positiv bzw. angedeutet ausgefallen, hatte also jede Gleichmäßigkeit vermissen lassen. Wir sehen, daß der Verlauf der Neuimpfung

in demselben Sinne spricht, wie die anamnestischen Feststellungen, nämlich, daß eine hochgradige Immunität nicht in entsprechender spezifischer Virulizidie des Blutes zum Ausdruck gelangt.

Was nun weiterhin den Einfluß dieser letzten Neuimpfung auf die Entstehung bzw. Verstärkung antivirulenter Fähigkeiten des Blutes anlangt, so konnte bei 6 von den 7 Versuchspersonen hinterher ein virulizider Versuch mit ihrem Serum vorgenommen werden. Er fiel, wie Tabelle II, lehrt, durchweg so aus, daß eine wesentliche Aenderung in der viruliziden Kraft des Serums nicht zu verzeichnen war. Ganz besonders gilt dies von dem Fall N., der eine ziemlich kräftige Impfreaktion nach Art eines Erstimpflings durchgemacht hatte. Das Serum dieses Falles wirkte kaum anders als vor der Impfung. Auch in den übrigen Fällen ließ sich höchstens bei L. und S. eine leicht gesteigerte Serumwirkung feststellen, und dies, obwohl hier gerade die Impfreaktion nur in Form einer Frühreaktion ohne Papel- oder Bläschenbildung aufgetreten war.

Die Blutuntersuchung nach der Neuimpfung hatte in den soeben erörterten Fällen immer nur einmal, und zwar 3 bzw. 4 Wochen später, stattgefunden. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, weil man nach den Erfahrungen des Tierexperimentes sowie nach den Erhebungen anderer Autoren (vgl. Béclère, Chambon und Ménard) auch beim Menschen dann schon eine Entwicklung virulizider Fähigkeiten des Serums erwarten durfte. Immerhin lag die Möglichkeit vor, daß die Bildung antivirulenter Substanzen sich beim Menschen mitunter in etwas anderer Weise vollzieht. Daher wurden einige Fälle mehrmals, also fortlaufend auf spezifische Blutveränderungen kontrolliert. Sie finden sich in einer besonderen Tabelle (III) aufgeführt.

Zunächst zeigt sich auch wieder die gleiche Erscheinung, daß das Serum der 5 Versuchspersonen vor der Neuimpfung keine nennenswerte virulizide Kraft besaß, auch das unverdünnte Serum vermochte in keinem Falle das Vakzinevirus völlig abzutöten. Wo aber antivirulente Fähigkeiten des Serums wenigstens angedeuteter kennbar waren (K., F., allenfalls auch J.), wurde hierdurch nicht etwa ein höherer Immu-

Tabelle III. Untersuchung des menschlichen Serums auf virulizide Kraft zu **verschiedenen Zeiten** nach der Revakzination (Vakzination).

No.	Name	Frühere Impfungen	Datum der Blutentnahme	Virulizider Versuch	Impfung, Datum und Reaktion	Datum der Blutentnahme	Virulizider Versuch: Lymphe 1/50	Virulizider Versuch: Lymphe 1/200	Bemerkungen
1	K.	Wiederholt geimpft, zuletzt 1916, reaktionslos	11. III. 1921	1/1 = + 1/20 = ++	12. III. Leichte Frühreaktion, ohne Papel- und Bläschenbild.	1. IV.	1/5 = — 1/20 = +++ 1/50 = +++	— — —	Ger. Verstärkung der viruliziden Serumwirkung durch die Neuimpfg.
						29. IV.	1/20 = +++ 1/50 = +++	— —	
2	D.	Wiederholt geimpft, vor 9 Jahren Variolois (?) überstand.	11. III. 1921	1/1 = +++ 1/20 = ++++	15. III. Pustelbild. m. Area, klein, aber typisch. 5 Pusteln	5. IV.	1/5 = ∓ 1/20 = +++ 1/50 = +++	— — —	Virulizide Wirkung nach der Impfung etwas erhöht
						11. VI.	1/20 = ++ 1/50 = ++	1/20 = + 1/50 = +++	
3	J.	Einmal vor 19 Jahren geimpft, typische Pustelbildung	30. V. 1921	1/1 = + 1/10 = +++	30. V. eine Pustel, abortiver Verlauf	14. VI.	1/20 = ++ 1/50 = ++	1/20 = + 1/50 = +	Geringe Verstärkung der viruliziden Wirkung durch die Neuimpfung
						25. VI.	1/5 = — 1/10 = +++ 1/20 = +++ 1/50 = ++ (?)	1/5 = + 1/10 = + 1/20 = + 1/50 = ++	
4	F.	Wiederholt geimpft, zuletzt 1919, reaktionslos	4. III. 1921	1/1 = + 1/20 = ++	12. III. eine typische Pustel mit Areabildung und Drüsenschwellung	22. III.	1/1 = ∓ 1/20 = ++ 1/50 = +++	—	Virulizide Wirkung nach der ersten Neuimpfung um ein geringes verstärkt; nach der zweiten keine Verstärkung nachweisbar
						27. III.	1/10 = ∓ 1/20 = ++	—	
						1. IV.	1/5 = — 1/20 = + 1/50 = +	—	
						13. IV.	1/30 = + 1/60 = ++	—	
						30. IV.	1/30 = +++ 1/60 = ++++ 1/100 = ++++	—	
						24. V.	1/5 = ∓ 1/10 = ∓	—	
					30. V. Nochmals geimpft, Verlauf reaktionslos	13. VI.	1/20 = (∓) 1/50 = +	1/20 = ∓ 1/50 = +++	
						25. VI.	1/5 = + 1/20 = ++ 1/50 = ++ 1/100 = +++	—	
5	Schn.	Bisher ungeimpft	1. IV. 1921	1/1 = ++++ 1/10 = ++++	3. V. Starke Reakt. mit typischer Pustelbild., Area, Drüsenschwellung, Fieber.	24. V.	1/5 = + 1/10 = +++ 1/20 = ++++ 1/50 = ++++	—	Die Vakzination (Erstimpfling) führt zur Bildung geringer Mengen virulizider Stoffe
						7. VI.	1/5 = — 1/10 = ∓ 1/20 = +++ 1/50 = +++	—	
						20. VI.	1/5 = ∓ 1/10 = ++ 1/20 = +++ 1/50 = +++	1/5 = — 1/10 = +++ 1/20 = +++ 1/50 = +++	

nitätsgrad des betreffenden Individumms bedingt. Im Gegenteil zeigte sich sogar, daß 2 von diesen 3 Personen die folgende Neuimpfung mit Pustelbildung beantworteten. Andrerseits sei freilich hervorgehoben, daß die beiden Fälle (Schn., D.), deren Seren ohne jede Spur antivirulenter Wirkung war, bei der Neuimpfung am stärksten, mit typischer Pustelbildung reagierten. Hier könnte also ein Zusammenhang zwischen einer hohen Empfänglichkeit und dem Fehlen spezifischer Antikörper angenommen werden. Der eine dieser Fälle (Schn.) betraf, wie früher erwähnt, einen noch niemals zuvor Geimpften (cf. Tabelle I), der andere (D.) bemerkenswerterweise denjenigen, der vor 9 Jahren wahrscheinlich Variolois überstanden hatte.

Bezüglich der Neuimpfung beansprucht wohl der Fall Schn. das größte Interesse, weil es sich um eine Erstimpfung handelte und hier die Entwicklung der Immunität in ihrem Zusammenhang mit humoralen Veränderungen in der reinsten Form zutage treten mußte. In der Tat ließ sich auch eine deutliche Virulizidie des Serums im Anschluß an die Impfung feststellen. In der Verdünnung 1:5 tötete das Serum das Vakzinevirus der Lymphe ganz oder nahezu vollständig ab, wobei der Höhepunkt der viruliziden Kraft nach 3—4 Wochen erreicht zu sein schien. Höher ging die Wirkung des Serums nicht, denn die Schwankungen, die bei Verwendung der Serumverdünnungen $^1/_{10}$ in den verschiedenen Versuchen zu verzeichnen waren, sind offenbar durch technische Zufälligkeiten bedingt.

Die 3 anderen Fälle, die ebenfalls zu Pustelbildung geführt hatten (D., J., F.), verhalten sich ähnlich. Auch hier ergibt sich eine etwas verstärkte virulizide Wirkung des Serums. Im Falle D. ist sie in der Verdünnung $^1/_5$ deutlich und führt zu fast völliger Abtötung des Virus, während vor der Impfung das Serum sogar in konzentriertem Zustande gänzlich wirkungslos gewesen war. Auch im Falle J. kann vielleicht eine geringe Zunahme der viruliziden Antikörper angenommen werden, obwohl hier die Deutung der Versuchsergebnisse nicht ganz klar liegt. Besonders der Vergleich zwischen der $^1/_{50}$ und der $^1/_{200}$ verdünnten Lymphe zeigt gewisse Unstimmigkeiten, spricht aber wohl dafür, daß die antivirulente Kraft

des Serums keinesfalls eine besonders starke ist. Für den Fall F. scheint eine deutliche Zunahme der viruliziden Stoffe aus dem Versuch vom 1. IV. hervorzugehen, also etwa 3 Wochen nach der Impfung. In der Verdünnung $^1/_5$ bewirkte das Serum eine völlige Abtötung, in stärkeren Verdünnungen ($^1/_{20}$, $^1/_{50}$) eine erhebliche Abschwächung des Virus. Trotzdem dürfen diese Werte nur mit Vorsicht beurteilt werden, denn die folgenden Untersuchungen lassen von einer so energischen Virulizidie nicht mehr viel erkennen. Man müßte sonst, wenn nicht etwa das Resultat vom 1. IV. nur durch einen Zufall so günstig ausgefallen ist, zu dem Schluß kommen, daß die viruilizide Serumwirkung sehr rasch wieder nachläßt. Bei dieser Betrachtungsweise ist es jedenfalls von Interesse, daß eine zweite Neuimpfung, der sich F. ca. $2^1/_2$ Monate nach der ersten unterzog und die reaktionslos verlief, auf den viruliziden Wert des Serums ohne jeden Einfluß blieb. 4 Wochen später verhielt sich das Serum fast genau so, wie zu Beginn des Versuchs, also vor den Neuimpfungen.

Was endlich den Fall K. angeht, so ist es schwer, zu sagen, ob durch die nur mit leichter Frühreaktion einhergehende Impfung die Neubildung viruilizider Stoffe ausgelöst worden ist. Es scheint fast so. In der Verdünnung $^1/_{20}$ zeigte sich das Serum vor und nach der Impfung allerdings ziemlich gleich unwirksam.

Zusammenfassend kann also auch das Ergebnis der in Tabelle III angeführten Versuche als ein im wesentlichen unvollkommenes bezeichnet werden. Die Prüfung des Serums zu verschiedenen Zeiten nach der Neuimpfung hat kein anderes Resultat gebracht als die erste Versuchsreihe (Tabelle II). Wir würden damit zu dem Schlusse kommen, daß bei dem Menschen die immunisierende Wirkung der Vakzination und Revakzination nicht Hand in Hand geht mit dem Auftreten oder der Erneuerung viruilizider Antikörper. Die Verhältnisse liegen hier unzweifelhaft anders als bei dem Kaninchen. Während im Tierversuch die Vakzineimmunität mit der Virulizidie des Blutserums vergesellschaftet ist, hat sich bei unseren Versuchspersonen ein derartiger Zusammenhang nicht nachweisen lassen. Weder hat zu Beginn der Versuche das Serum der einzelnen

Personen eine ihrem Immunitätszustande entsprechende antivirulente Wirkung ausgeübt, noch wurde durch Neuimpfung und mehr oder minder starke Impfreaktion eine stärkere Antikörperbildung ausgelöst. Trotz unseres nicht sehr großen Materials und trotz gewisser Unzulänglichkeiten der Technik darf dieses Resultat als zutreffend angesehen werden. Sollte es selbst möglich sein, durch weitere technische Verbesserungen des viruliziden Versuchs doch noch feinere Unterschiede aufzudecken und für den immunisierten Organismus eine etwas stärkere Viruliziclie festzustellen, so bleiben immerhin zwei wichtige Tatsachen bestehen: Einmal nämlich, daß die Viruzidie des Serums vakzineimmuner Menschen nicht im entferntesten heranreicht an die Wirkung des Serums immunisierter Kaninchen, ja daß eine einmalige Infektion des Kaninchens in dieser Hinsicht unvergleichlich stärker wirkt als wiederholte Impfungen des Menschen; und ferner, daß die bescheidenen antivirulenten Kräfte des menschlichen Immunserums keinen rechten Zusammenhang mit dem Immunitätsgrad der betreffenden Personen erkennen lassen. So hat zwar die Mehrzahl der geimpften Versuchspersonen ein Serum geliefert, das, im Vergleich zu dem normalen Serum ungeimpfter Individuen, über eine schwache virulizide Kraft verfügte, doch ließen sich aus den gefundenen Werten engere Beziehungen zu dem Immunitätszustand nicht ableiten.

Auf die Frage, inwieweit hierdurch die humorale Deutung der Pockenimmunität eingeschränkt oder erschüttert wird, soll nicht weiter eingegangen werden. Es wird nötig sein, zunächst noch weitere Erfahrungen zu sammeln, insbesondere auch darüber, wie sich das Serum solcher Menschen im viruliziden Versuch verhält, welche eine Pockenerkrankung überstanden haben. Nach den in der Literatur vorliegenden Angaben könnten hier andere Resultate zu gewärtigen sein.

Meine Versuche haben also nicht so deutliche Ergebnisse gehabt, wie nach den vorliegenden Literaturangaben zu erwarten gewesen wäre. Zu einem Teil liegt das sicherlich an der Versuchstechnik und der Art der Beurteilung. Béclère, Chambon und Ménard und ebenso Martius haben ausschließlich mit unverdünntem Serum gearbeitet und das Serum-Virus-Gemisch auf das Rind verimpft: aus der Zahl der nicht

angehenden Impfschnitte schlossen sie auf den Grad der Virulizidie, aber völlige Abtötung des Virus, d. h. Fehlen des Impferfolges an sämtlichen Schnitten haben sie nie erhalten. Auch v. Prowazek und de Beaurepaire Aragão haben nur unverdünntes Serum geprüft, und zwar auf der Kaninchenkornea, und als Indikator der Impfwirkung das Verhalten der Guarnierischen Körperchen untersucht; da deren Bildung in keinem Falle völlig ausblieb, schlossen sie auf mangelnden Antikörpergehalt des Serums. Dagegen stimmt meine Versuchsanordnung und Beurteilung mit der von Sato angewendeten überein; wenn er trotzdem bei der Revakzination des Kaninchens so viel deutlichere Resultate erhalten hat, als ich bei der Revakzination des Menschen, so kann das nur am Versuchsobjekt liegen. Der Umstand, daß das Kaninchen auf einer nicht nur relativ, sondern auch absolut sehr viel größeren Körperoberfläche geimpft wird, mag dabei eine Rolle spielen, man sollte aber meinen, daß dieser Unterschied durch die bedeutend höhere Empfänglichkeit des Menschen für Vakzine ausgeglichen würde.

Zusammenfassung.

Das Serum wiederholt geimpfter Menschen (11) wurde im viruliziden Versuch geprüft. Zum Vergleich wurde auch das Serum ungeimpfter Personen (4) in gleicher Weise untersucht.

Das normale menschliche Serum übt, wie sich zeigte, keine abtötende Wirkung auf das Vakzinevirus aus, auch nicht in unverdünntem Zustande. Wohl aber ließ das Serum der Geimpften in mehreren Fällen eine leichte viruzide Wirkung erkennen. Diese reichte meist nur aus, um die Virulenz der Lymphe etwas abzuschwächen.

Durch die Neuimpfung von vakzinierten und revakzinierten Personen wurde trotz zum Teil starker Impfreaktionen mit Pustelbildung, wenn überhaupt, nur eine mäßige Steigerung der viruliziden Serumkräfte erzielt. Ein erwachsener Erstimpfling, dessen Serum vorher frei von viruliziden Antikörpern war, lieferte ein schwach antivirulentes Serum.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen des Tierexperimentes (Kaninchen) treten viruzide Antikörper im Blute vakzine-

immunisierter Menschen nur spärlich und unregelmäßig auf. Quantitative Beziehungen dieser Antikörper zu dem Immunitätsgrad des betr. Individuums sind nicht ersichtlich.

Literatur.

Béclère, Chambon et Ménard, Annal. Pasteur, T. 13, 1899.
Doerr und Vöchting, Rev. génér. d'ophthalmol., T. 34, 1920.
Gastinel, Thèse de Paris, 1913 (zit. nach Gins).
Gins, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., Bd. 82, 1916.
— Der Pockenschutz des deutschen Volkes. Berlin, Rich. Schoetz, 1917.
— Hyg. Rundsch., 1919.
Groth, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., Bd. 92, 1921.
Grüter, Arch. f. Augenheilk., Bd. 70, 1911.
Haendel, Gildemeister und Schmitt, Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 85, 1921.
Martius, Arb. a. d. Kais. Ges.-Amt, 1900, No. 17.
Paschen, Deutsche med. Wochenschr., 1920.
Paul, Wiener med. Wochenschr., 1915.
v. Prowazek, Arb. a. d. Kais. Ges.-Amt, Bd. 23, 1906.
— et de Beaurepaire Aragão, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Bd. 1, 1909.
Sato, K., Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 32, 1921.
Sobernheim, Deutsche med. Wochenschr., 1921, No. 24.
Sternberg, Centralbl. f. Bakt., Bd. 19, 1896.
Süpfle, Arch. f. Hyg., Bd. 70, 1911.
— und Eisner, Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 60, 1911.
Teissier et Gastinel, Compt. rend. Acad. d. sc., T. 155, 1912.

[Aus dem Hyg.-bakt. Institut des Hauptgesundheitsamtes der Stadtgemeinde Berlin.]

Die Löslichkeit heterophiler Rezeptoren.
(Hämolysinstudien II.)

Von Dr. **Fritz v. Gutfeld**, Bakteriologe.

(Eingegangen bei der Redaktion am 10. September 1921.)

Mit dem Problem des Nachweises gelöster Rezeptoren haben sich schon eine Reihe von Untersuchern beschäftigt.

Neißer und Shiga (1) konnten aus Typhus- und Dysenteriebazillen mittels Kochsalzlösung Extrakte herstellen, die in gewissen Versuchanordnungen Rezeptorenfunktionen ausübten.

Georgi und Seitz (2) glauben, aus organantiserumbeladenen Organsuspensionen durch Behandlung mit Natronlauge den Ambozeptor und den Rezeptor wiedergewonnen zu haben. Es war aber nur die Ambozeptorwirkung, und auch diese nur im alkalischen Medium nachweisbar; nach Neutralisation der Zentrifugate wurde diese Wirkung wieder aufgehoben. Die Autoren schließen aus ihren Ergebnissen, daß auch die Rezeptoren in Lösung gegangen sind, und daß sie sich beim Neutralisieren wieder mit dem Ambozeptor zu einem unwirksamen Gemisch vereinigt haben.

Friedberger und Suto (3) konnten mit eiweiß- und zuckerfreiem Urin von Meerschweinchen und Pferden bei Kaninchen heterogenetische Hammelbluthämolysine vom Forssmanschen Typus erzeugen. Es müssen also in dem benutzten Urin antigen wirkende, Immunkörper bildende Substanzen gelöst gewesen sein. Es gelang den Autoren aber nicht, im gleichen Material Antikörper bindende Stoffe nachzuweisen.

Georgi (4) hat aus Meerschweinchenniere durch Alkoholbehandlung die bindende Rezeptorenfunktion quantitativ in Lösung erhalten; der Rückstand enthielt keine Spur mehr davon. Ebenso konnte er durch Behandlung mit Natronlauge die bindenden Rezeptoren der Meerschweinchenniere in Lösung bringen.

In den Versuchen von Sachs und Guth (5), die mit alkoholischen Organextrakten Ausflockungen vorgenommen haben, handelt es sich wohl um die gleichen gelösten Stoffe.

Auch Landsteiner (8) hat heterophile Organrezeptoren in Lösung gebracht.

Meine Versuche, heterophile Rezeptoren in Lösung zu bringen und sie im Bindungsversuch nachzuweisen, wurden vor längerer Zeit im Anschluß an Untersuchungen über den Nachweis gekochten Pferdefleisches (6) nach Sachs und Georgi unternommen. Das Tatsachenmaterial an sich habe ich bestätigen können; es gelang auch mir, durch Behandlung der Organe mit Natronlauge oder Salzsäure oder Alkohol, Substanzen in Lösung zu bringen, die, mit Organantiserum gemischt, die hämolytische Kraft dieses Serums zum Verschwinden bringen.

Um jedoch beweisen zu können, daß dieser Vorgang nicht auf einer unspezifischen, allgemein antihämolytischen Eigenschaft der gelösten Bestandteile oder des Lösungsmittels beruht, braucht man noch einige Kontrollversuche, die bisher, soweit mir bekannt, nicht angestellt worden sind. Erst wenn ihr Ausfall das erwartete Ergebnis bringt, dürfte der Nachweis geführt sein, daß es sich tatsächlich um die Lösung der heterophilen Rezeptoren durch die Lösungsmittel und ihre spezifische Bindung im Hämolyseversuch handelt.

Arbeitet man mit alkalischen oder sauren Flüssigkeiten, so ist zu beachten, daß bei der Behandlung der Organe mit Lauge bzw. Säure Alkali- bzw. Azidalbuminate entstehen. Fügt man später die berechnete Menge Säure bzw. Alkali zwecks Neutralisation hinzu, so muß man sich davon überzeugen, ob man es wirklich mit einer neutralen Mischung zu tun hat.

In besonderen Versuchen wurde festgestellt, daß z. B. bei der Behandlung von Pferdefleisch mit n/10 NaOH bzw. n/10 HCl ein recht erheblicher Teil des Alkalis bzw. der Säure im Verlauf einer halben Stunde von dem Fleisch gebunden wird, so daß zur Neutralisation nur etwa die Hälfte bis Zweidrittel der berechneten Menge Säure bzw. Alkali erforderlich waren. — Allerdings habe ich mich andererseits davon überzeugt, daß die von Georgi benutzten Alkalikonzentrationen an sich nicht imstande waren, Hammelblut zu lösen.

Ferner entsteht beim Arbeiten mit Natronlauge und Salzsäure durch deren Vereinigung Kochsalz, das die Kochsalzkonzentrationen der Lösungen beeinflußt. Ich habe daher regelmäßig den Kochsalzgehalt der zum Versuch benutzten neutralisierten Lösungen austitriert und auf die Konzentration von 0,85 Proz. Kochsalz gebracht. Danach wurde die Kochsalzkonzentration nochmals titrimetrisch kontrolliert. Diese beiden Kontrollen hat Georgi nicht angestellt.

Während die beiden eben beschriebenen Kontrollen (Reaktion und Kochsalzkonzentration) bei den in Betracht kommenden geringen Säure- und Alkalimengen praktisch keine erhebliche Rolle spielen, ist die dritte Kontrolle von entscheidender Bedeutung. Es liegt nämlich die Möglichkeit vor, daß die mit verschiedenen Lösungsmitteln hergestellten Extrakte nicht nur die hämolytische Wirkung des Organantiserums, also des homologen Antikörpers, hemmen, sondern daß diese Extrakte ganz allgemein antihämolytische Eigenschaften haben könnten. Das müßte sich in dem Ausbleiben der hämolytischen Wirkung heterologer (nicht heterogenetischer!) Hämolysine, hier also z. B. eines durch Injektionen von Hammelblut gewonnenen Hammelblutimmunhämolysins bemerkbar machen. Um hierüber Klarheit zu bekommen, habe ich die Versuche in Parallelreihen, einmal mit Organantiserum,

daneben mit gewöhnlichem (durch Injektion von Hammelblut gewonnenem) Ambozeptor angesetzt.

Versuch vom 30. X. 1919.

Organantiserum Ia. Titer[1]) am Versuchstage 1:800.
Hammelblutimmunambozeptor vom Titer[1]) 1:1800.
Frische Pferdeniere gehackt.
Je 3 g Pferdeniere werden
1) mit 30 ccm n/100 NaOH,
2) mit 30 ccm n/100 HCl,
3) mit 30 ccm Alkohol absol.
2 Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt. Nach Absitzenlassen werden die überstehenden Flüssigkeiten bis zu völliger Klarheit (zum Teil durch Berkefeldkerzen) filtriert und ihre Menge gemessen (Extrakte).

Die Rückstände werden mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, je 1 g wird zum Versuch benutzt (Rückstände).

Die Extrakte werden auf dem Wasserbade eingedampft[2]). Der beim Eindampfen verbliebene Rest wird mit einigen Kubikzentimetern Aqua dest. aufgenommen, neutralisiert, isotonisch gemacht (titrimetrische Kontrolle) und mit physiologischer Kochsalzlösung zum ursprünglich gemessenen Volumen aufgefüllt. Die isotonischen, neutralen Flüssigkeiten werden nochmals bis zur völligen Klarheit filtriert.

Mit einem Teil der so gewonnenen Extrakte wurde zunächst festgestellt, daß die Extrakte an sich keine hammelblutlösende Eigenschaft haben. Dann folgte die eigentliche Prüfung:

Reihe 1:

a) Jeder der 3 Extrakte wird im Volumen von 10 ccm mit Organantiserum (60 lösende Dosen) versetzt.

b) Je 1 g der 3 Rückstände wird in 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung mit Organantiserum (60 lösende Dosen) versetzt.

c) Kontrolle: 60 lösende Dosen Organantiserum in 10 ccm Kochsalzlösung unbehandelt.

Reihe 2 wird in genau der gleichen Weise angesetzt, nur daß statt Organantiserum gewöhnlicher (durch Injektion von Hammelblut gewonnener)

---

1) Zur Titerbestimmung wurde 1 ccm Serumverdünnung mit 0,5 ccm 5-proz. Hammelblutes etwa 10—15 Minuten bei Zimmertemperatur belassen, dann 0,5 ccm 10-proz. Komplements zugegeben. Auch bei allen übrigen hämolytischen Versuchen wurde zunächst der Ambozeptor mit dem Hammelblut vermischt und erst nach 10—15 Minuten Komplement zugegeben.

2) Dies kann unbedenklich geschehen, da die heterophilen Rezeptoren, wie in einer früheren Arbeit (7) mitgeteilt wurde, in hohem Grade thermoresistent sind.

Hammelblutimmunambozeptor gleichfalls in der Menge von 60 lösenden Dosen zugefügt wird.

Bindung 1 Stunde im Wasserbad bei 37 °, Filtration und quantitative Auswertung der Filtrate auf hämolytische Eigenschaften.

Das Ergebnis gibt die Tabelle wieder.

Tabelle.

Reihe 1: Organantiserum.

1 ccm in fallenden Verdünnungen	a) Extrakte hergestellt mit			b) Rückstände der Behandlung mit			c) Kontrolle
	NaOH	HCl	Alk. absol.	NaOH	HCl	Alk. absol.	
Unverdünnt	Keine Hämolyse						++++
1/2							++++
1/4							+++

++++ = komplette Lösung.

Reihe 2: Gewöhnlicher (durch Injektion von Hammelblut gewonnener) Hammelblutimmunambozeptor.

1 ccm in fallenden Verdünnungen	a) Extrakte hergestellt mit			b) Rückstände der Behandlung mit			c) Kontrolle
	NaOH	HCl	Alk. absol.	NaOH	HCl	Alk. absol.	
Unverdünnt	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1/2	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1/4	++++	++++	+++(+)	++++	++++	++++	++++

Sowohl die mit den drei verschiedenen Extraktionsmitteln hergestellten Auszüge als auch die nach der Extraktion verbliebenen Rückstände binden die Gesamtmenge des dargereichten heterogenetischen Ambozeptors, während die hämolytische Funktion des isogenetischen (durch Injektion von Hammelblut gewonnenen) Hammelblutimmunambozeptors in allen Röhrchen unbeeinflußt bleibt. Die drei benutzten Auszüge enthielten also gelöste Rezeptoren, welche in spezifischer Weise den heterogenetischen Ambozeptor verankert haben.

Während in dem mitgeteilten Versuch das Organantiserum sowohl vom Auszug als auch vom Rückstand verankert wurde,

konnten in einem Versuch vom 6. XI. 1919 Unterschiede im Bindungsvermögen von Extrakt und zugehörigem Rückstand festgestellt werden. Der mit Natronlauge hergestellte Auszug verhinderte die hämolytische Wirkung des Organantiserums, der Rückstand ließ sie unbeeinflußt. Wir müssen also annehmen, daß in diesem Falle die bindenden Rezeptoren quantitativ in den Auszug übergegangen sind. Auch in allen anderen Versuchen ähnlicher Anordnung zeigte sich, daß die Lösungsmittel einen mehr oder minder großen Teil der Organrezeptoren in Lösung bringen, und daß in jedem Falle die antikörperbindende Kraft streng auf das heterogenetische System eingestellt ist.

Das Verhältnis der Rezeptorenmenge zur Menge des Lösungsmittels, die Länge der Extraktionszeit, sowie die Quantität des zur Bindung vorgelegten Ambozeptors bestimmen das quantitative Ergebnis.

Zusammenfassung.

1) Aus Organen vom heterogenetischen Typus lassen sich Rezeptoren durch verschiedene Lösungsmittel in Lösung bringen.

2) Der gelöste Rezeptor läßt sich durch die Verankerung des heterogenetischen Antikörpers nachweisen.

3) Diese Verankerung ist eine spezifische, sie tritt mit einem durch Injektion von Hammelblut gewonnenen Hammelblutimmunambozeptor nicht ein.

Literatur.

1) Neißer und Shiga, Deutsche med. Wochenschr., 1903.
2) Georgi und Seitz, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 26, H. 5.
3) Friedberger und Suto, ebenda, Bd. 28, H. 3–5.
4) Georgi, Arb. a. d. Inst. f. experim. Ther., 1919, H. 9.
5) Sachs und Guth, Med. Kl., 1920, H. 6.
6) Seligmann und v. Gutfeld, Berl. klin. Wochenschr., 1919.
7) v. Gutfeld, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 33, Heft 3.
8) Landsteiner, Biochem. Zeitschr., Bd. 119.

[Aus dem Hygienisch-bakteriologischen Institut im Hauptgesundheitsamt der Stadtgemeinde Berlin.]

Ueber antigene Eigenschaften des Tuberkulins.

Von Prof. Dr. **E. Seligmann** und Dr. **F. Klopstock.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 18. September 1921.)

Die biologische Bedeutung des Tuberkulins ist noch immer strittig. Klinisch stellt die Tuberkulinreaktion den reinsten Typus einer spezifischen Ueberempfindlichkeitsreaktion dar, biologisch unterscheidet sie sich in wichtigen Punkten von den eingehend durchforschten Formen der Anaphylaxie. Klinische und therapeutische Erfahrungen sprechen für eine spezifische Wirkung des Tuberkulins, die allerdings nur unter bestimmten Bedingungen — im tuberkulosekranken Organismus — in die Erscheinung tritt; biologisch ist der Nachweis der Antigennatur des Tuberkulins durchaus noch nicht geklärt. Und dabei hängt von diesen Fragen ein nicht geringer Teil unseres Verständnisses der Vorgänge im tuberkulösen Organismus ab. Es sei nur daran erinnert, wie seinerzeit Wassermann und Bruck[1]) ihre Erklärung der Tuberkulinreaktion und der spezifischen Herderscheinungen auf den Antigencharakter des Tuberkulins basierten, während neuerdings beispielsweise Selter[2]) gerade das Fehlen antigener Eigenschaften zur Stütze seiner Reizstofftheorie macht. Jeder Beitrag zu diesen theoretisch so bedeutungsvollen Problemen dürfte daher willkommen sein, auch wenn er noch nicht die endgültige Klärung herbeiführt.

Die im folgenden mitzuteilenden Versuche wurden in den Jahren 1913 und 1914 angestellt und durch den Krieg unterbrochen. Nach Kriegsende wurden sie wieder aufgenommen; die neuen Versuche, die an einer Serie von

---

1) Deutsche med. Wochenschr., 1906.

2) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 32, 1921.

20 Tieren vorgenommen waren, führten jedoch zu keinem Resultat, da die Versuchstiere sämtlich im Verlauf der Vorbehandlung eingingen. Obwohl wir bisher keine Gelegenheit hatten, die Untersuchungen neuerdings weiterzuführen, veranlaßt uns die neuerwachte Diskussion über die Antigennatur des Tuberkulins, über die bisherigen Versuchsergebnisse zu berichten. Wir arbeiteten mit einem von den Höchster Farbwerken freundlichst zur Verfügung gestellten, staatlich geprüften Alttuberkulin. Die uns überlassene Menge ermöglichte es, alle Tiere mit demselben Präparat vor- und nachzubehandeln. Die Nachkriegsversuche wurden gleichfalls mit Höchster Alttuberkulin vorgenommen, das jedoch aus dem freien Handel bezogen war.

Die Frage, die wir beantworten wollten, lautete: Läßt sich mit Alttuberkulin am gesunden Meerschweinchen auf irgendeine Weise eine spezifische Ueberempfindlichkeit erzeugen?

1. Versuchsreihe: Einmalige subkutane Vorbehandlung (0,1—0,2 ccm unverdünntes Tuberkulin). Intravenöse Reinjektion von 0,1 ccm unverdünnten Tuberkulins nach 3 Wochen. 5 Versuchstiere. Ergebnis völlig negativ; in keinem Falle traten irgendwelche Erscheinugen der Ueberempfindlichkeit auf, auch keine irgendwie beachtlichen Veränderungen der Körperwärme.

2. Versuchsreihe: Wiederholte subkutane Vorbehandlung, intravenöse Reinjektion. 4 Versuchstiere.

Vorbehandlung: Je 0,2 ccm Tuberkulin subkutan am 23. IV., 25. IV., 28. IV., 5. V., 8. V. und 11. V. 1914. Reinjektion am 19. V. 1914. (Siehe Tabelle I.)

Ergebnis: In keinem Fall tödlicher Ausgang. Ein Tier zeigt mäßig starke Schokerscheinungen, die von einem über 1 Stunde anhaltenden Temperatursturz begleitet sind (139); ein zweites Tier zeigt bei minimalen klinischen Symptomen vorübergehende deutliche, wenn auch schwächere Temperatursenkung (137); die beiden anderen Tiere weisen beim Fehlen charakteristischer Krankheitserscheinungen leichte Temperaturerhöhung auf, die nach etwa 1 Stunde einsetzt (Hyperthermie im Sinne von Friedberger und Mita[2]).

Tabelle I.

	Tier 137 (400 g)	Tier 138 (400 g)	Tier 139 (340 g)	Tier 140 (420 g)
Dosis d. Reinjektion	0,15 ccm iv.	0.2 ccm iv.	0,15 ccm iv.	0,15 ccm iv.
t. vor der Reinjektion	38,8°	38,0°	38,0°	37,5°
t. 30 Min. n. d. Reinj.	34.6°	38.0°	33,7°	37,8°
50 " " " "	35,7°	39,3°	34,1°	39,3°
80 " " " "	38,2°	39,7°	—	39,4°
2 Std. " " "	38,8°	39,6°	37,8°	39,4°
3 " " " "	—	38,5°	38,2°	38,8°
Klinische Symptome	leichtes Jucken, Krächzen u. Schauern	kurze Reitbahnbeweg., schnelle Erholung	sofort Krächzen u. Jucken, forcierte Atmung, fällt um, bleibt auf der Seite liegen, erholt sich etw. nach 1 Stunde	keine Erscheinungen

2 unvorbehandelte Meerschweinchen, die als Kontrollen 0,2 ccm Tuberkulin intravenös erhielten, zeigten keinerlei klinische Erscheinungen, die Temperatur sank im Anschluß an die Injektion um 0,8 bzw. 1,1°, um dann schnell wieder anzusteigen.

3. Versuchsreihe: Wiederholte intrakutane Vorbehandlung. Intravenöse Reinjektion. 6 Versuchstiere.

Tabelle II.

Tier No.	Vorbehandlung	Reinjektion	Ergebnis
105 (230 g)	an drei verschied. Stellen itk. 0,02 g: 13. III., 16. III., 18. III., 21. III., 26. III. 1914	0,1 ccm iv. am 8. IV.	negativ
106 (240 g)	dgl.	0,1 ccm iv. am 8. IV.	leicht. Schauern, Temperatursturz von 37,2° auf 33,8°, erholt sich schnell. t. nach 60 Min. 35,8°
113 (270 g)	an drei verschied. Stellen itk. 0,02, 0,04 u. 0,08 g: 26. III., 28. III., 30. III., 3. IV. 1914	0,12 ccm iv. am 20. IV.	negativ
114 (390 g)	dgl.	0,1 ccm iv. am 20. IV.	negativ
121 (320 g)	an einer Stelle itk. 0,02 g: 8. IV., 17. IV., 25. IV.	0,15 ccm iv. am 1. V.	negativ
122 (300 g)	dgl.	0,15 ccm iv. am 1. V.	negativ

2 Kontrollen (unbehandelte Tiere) zeigen nach intravenöser Injektion von 0,1 und 0,15 ccm Tuberkulin keine Erscheinungen, auch keine Temperatursenkung.

Ergebnis: Von 6 Tieren, die sämtlich mehrfach intrakutan vorbehandelt waren, zeigt bei der Reinjektion eines ohne nennenswerte klinische Symptome einen deutlich ausgeprägten, kurz dauernden Temperatursturz.

4. Versuchsreihe: Wiederholte Vorbehandlung, abwechselnd subkutan und intrakutan. Intravenöse Reinjektion. 12 Versuchstiere. Die folgenden Tabellen gliedern die Tiere nach der Art der Vorbehandlung.

a) Vorbehandlung: 16. I. 0,5 ccm Tuberkulin sk., 30. I. 0,02 itk, 3. II. 0,2 ccm sk, 10. II. 0,02 itk, 17. II. 0,2 sk.

Tabelle III.

	Tier 39 (300 g)		Tier 40 (280 g)	Tier 41 (320 g)	Tier 43 (360 g)
Dosis der Reinjektion	0,08 ccm iv. am 25. III.	0,1 ccm iv. am 17. IV.	0,1 ccm iv. am 17. IV.	0,1 ccm iv. am 17. IV.	0,1 ccm iv. am 17. IV.
t. vor der Reinjektion	37,4°	37,0°	37,8°	37,2°	37,9°
t. 15 Min. n. d. Reinj.	37,0°	33,2°	34,3°	34,2°	—
30 " " " "	37,2°	31,3°	33,1°	33,2°	—
45 " " " "	37,4°	29,7°	33,7°	32,0°	—
60 " " " "	—	29,0°	33,7°	32,1°	—
75 " " " "	—	29,0°	34,2°	—	—
90 " " " "	—	—	35,7°	33,0°	—
120 " " " "	—	—	—	33,4°	—
180 " " " "	—	32,1°	—	34,3°	—
Klinische Symptome	keine Erscheinungen	angestrengte Atmung, Tier ist sehr schlapp, legt sich mehrfach auf die Seite, erholt sich	Krächzen, angestrengte Atmung, Schauern, erholt sich schnell	sof. Jucken, Krächzen, angestrengte Atmung, erholt sich schnell	sofort schwerste Atemnot, Krächzen, Jucken, Streckkrämpfe, nach 8 Min. Seitenlage m. klon. Krämpfen. Tot nach 11 Min. Sektion: stärkste Lungenblähung; Blut flüssig. Kein Zeichen von Tbc.

b) Vorbehandlung: An drei verschiedenen Stellen itk. 0,02, 0,04 und 0,08 ccm Tuberkulin am 20. I., 5. II., 13. II.; am 17. II. 0,2 sk., am 17. III. 0,02 itk.

Tier 46: Reinjektion am 24. III. mit 0,08 ccm Tuberkulin iv., sofort schwerste Atemnot, Krächzen, Parese der Extremitäten, Krämpfe. Tod nach 10 Minuten. Sektionsbefund: Lungenblähung, Blut im Herzen flüssig, keine Zeichen von Tbc.

Tier 47: Reinjektion am 24. III. mit 0,08 ccm Tuberkulin iv. Sofort schwere Atemnot, Krächzen, Tier wird schlapp; wenn man es auf die Seite legt, bleibt es so liegen. Temperatur (vorher 38,0°) nach 20 Min. 33,6°, nach 40 Min. 30,4°. Nach etwa 2 Stunden erholt sich das Tier und überlebt.

Am folgenden Tage nochmalige Reinjektion mit 0,15 ccm Tuberkulin iv. Sofort schwerste Atemnot, Tod unter Krämpfen nach 5 Minuten. Sektionsbefund: stärkste Lungenblutung, Herzblut flüssig, keine Zeichen von Tuberkulose.

c) Vorbehandlung: 23. IV. 0,2 Tuberkulin sk., 30. IV. 0,04 itk., 4. V. 0,2 sk., 6. V. 0,04 itk, 8. V. 0,2 sk., 11. V. 0,04 itk, 15. V. 0,2 sk.

Tabelle IV.

	Tier 141 (400 g)		Tier 142 (440 g)	
Dosis der Reinjektion	0,2 ccm iv. am 28. V.	0,275 ccm iv. am 30. V.	0,2 ccm iv. am 28. V.	0,275 ccm iv. am 30. V.
t. vor der Reinjektion	37,6°	37,8°	37,0°	37,1°
t. 30 Min. nach d. Reinj.	34,8°	37,0°	33,2°	35,8°
1 Std. „ „ „	36,3°	39,3°	33,3°	36,6°
2 „ „ „ „	36,6°	39,1°	34,4°	36,9°
3 „ „ „ „	38,1°	38,6°	36,4°	37,0°
Klinische Symptome	Unruhe, Jucken u. Niesen, angestrengte Atmung. Erholt sich schnell	leichtes Zittern u. Jucken, bleibt gesund	Angestrengte Atmung, allgemeine Schwäche, erholt sich nach etwa 20 Min.	keine Erscheinungen, bleibt gesund

	Tier 143 (470 g)		Tier 144 (340 g)	Tier 145 (Kontrolltier)
Dosis der Reinjektion	0,2 ccm iv. am 28. V.	0,275 ccm iv. am 30. V.	0,2 ccm iv. am 28. V.	0,5 Tb. iv.
t. vor der Reinjektion	38,2°	38,2°	37,7°	37,0°
t. 30 Min. nach d. Reinj.	35,4°	37,8°	32,1°	37,0°
1 Std. „ „ „	35,3°	37,9°	30,3°	38,5°
2 „ „ „ „	37,9°	39,5°	†	38,0°
3 „ „ „ „	39,0°	39,3°	sofort schwerste	37,4°
Klinische Symptome	beschleunigte, oberflächliche Atmung, bleibt gesund	keine Erscheinungen, bleibt gesund	Atemnot, Jucken, Parese der Extremitäten, verendet in Seitenlage unter schwachen Zuckungen nach 70'. Sektion: keine Lungenblähung, Blut flüssig	starkes Schauern, sonst keine Erscheinungen, bleibt gesund

d) Vorbehandlung: 15. XII. 1913: 0,5 ccm Tuberkulin sk., 29. XII. 0,02 itk., 2. I. 0,2 sk., 6. II. 0,02 itk., 10. II. 0,02 itk., 17. II. 0,2 sk., 25. II. 0,02, 0,04 und 0,08 itk., 9. III. 0,5 sk. Reinjektion iv. am 24. III. iv. 0,08. Unbehandeltes Kontrolltier am 24. III. 0,1 iv. Keine Erscheinungen, Temperatur sinkt nach 15 Min. um 2,0° auf 35,0°.

Tier 12: Nach Reinjektion schwere tonisch-klonische Zuckungen, bleibt dann längere Zeit auf der Seite liegen, mitunter von Krämpfen geschüttelt; dauernd angestrengte Atmung. Temperatur (vorher 38,1°) nach 20 Min. 33,6°, allmählich Erlöschen aller Reflexe. Tod nach 3 Stunden. Sektionsbefund: Keine Lungenblähung, Blut flüssig, keine Zeichen von Tbc.

Tier 15: Nach Reinjektion starkes Jucken und Krächzen; allgemeine Asthenie, bleibt, auf die Seite gelegt, so liegen. t. (vorher 37,4°) nach 30 Min. 32,9°. Nach 40 Min. leichte Krämpfe unter Parese der hinteren Extremitäten. Tod nach 45 Min. Sektionsbefund: Keine Lungenblähung. Blut flüssig; in Milz und Leber mehrere kleine Abszesse, bakteriologisch keine Tbc., grampositive Kokken. Sonstige Organe o. B.

Ergebnis der 4. Versuchsreihe: Von 12 Versuchstieren verenden 6 nach der Reinjektion, 3 von ihnen unter dem Bilde des typischen anaphylaktischen Shocks, 3 unter protrahierten, shockartigen Erscheinungen im Spättod (45 Min. bis 3 Std.). Von den übrigen Tieren reagieren 4 mit mehr oder minder deutlichen klinischen Symptomen und ausgesprochenem Temperatursturz. Die beiden letzten Tiere der Reihe zeigen gleichfalls Andeutungen anaphylaktischer Symptome und Temperaturveränderungen geringen Grades, die als leichte Hypo- und Hyperthermien zum wenig charakteristischen Ausdruck gelangen. — Das etwaige Vorhandensein einer Antianaphylaxie läßt sich aus der geringen Zahl der wiederholten Reinjektionen nicht mit Sicherheit erschließen oder ablehnen.

Insgesamt ergeben die 4 Versuchsreihen an 27 Tieren (ohne die Kontrollen), daß es durch besonders intensive, vielfach wiederholte Vorbehandlung mit Alttuberkulin nicht selten gelingt, tuberkulosefreie Meerschweinchen spezifisch überempfindlich gegen das Antigen der Vorbehandlung zu machen. Die Tiere, die anaphylaktisch geworden sind, reagieren mit den bekannten Erscheinungen des anaphylaktischen Schocks unter Temperatursturz. Der anaphylaktische Zustand tritt nicht regelmäßig ein, am konstantesten findet er sich noch nach kombinierter subkutaner und intrakutaner Vorbehandlung.

Daß es sich nicht um eine Ueberempfindlichkeit gegen die Eiweißbestandteile des Nährbodens selbst handelt, wurde in besonderem Kontrollversuche geprüft: Glyzerinbouillon, wie sie zur Züchtung von Tuberkelbazillen und zur Herstellung des Tuberkulins verwendet wird, wurde — analog der Tuberkulinbereitung — auf $^1/_{10}$ des Volumens eingeengt und mit Phenol versetzt. Mit diesem Material wurden 3 Meerschwein-

chen nach dem Schema der Versuchsreihe 4b abwechselnd subkutan und intrakutan vorbehandelt. Die Reinjektion erfolgte 3 Wochen nach der letzten Behandlung intravenös mit 0,1 ccm Tuberkulin. Keines der Tiere wies Krankheitserscheinungen erheblicher Art auf; ein Tier (89) zeigte eine vorübergehende Temperatursenkung um 2,4° unter stärkerem Schauern und Jucken, blieb aber im übrigen gesund.

Es sei ausdrücklich betont, daß die mitgeteilten Ergebnisse zunächst für die Deutung der spezifischen Tuberkulinreaktion ohne Belang sind; sie können nur dartun, daß dem Kochschen Alttuberkulin an sich antigene Eigenschaften nicht fehlen. Eigenschaften, die (infolge der Erhitzung des Ausgangsmaterials?) nur schwach vorhanden sind und die sich nur unter besonderen Versuchsbedingungen nachweisen lassen[1].

---

1) Unsere Ergebnisse stehen somit im Gegensatz zu den negativen, allerdings nicht sehr ausgedehnten Erfahrungen Ungermanns (Arb. a. d. Gesundheitsamte, Bd. 48); dagegen stimmen sie mit den Resultaten einiger ausländischer Autoren dem Sinne nach überein. Calmette, Breton und Petit (Soc. Biol., 1907, T. 63) beobachteten nach intravenöser und intrastomachaler Einverleibung geringer Tuberkulindosen beim Kaninchen eine kurzdauernde, schwache Ueberempfindlichkeit der Conjunctiva (Ophthalmoreaktion). Marie und Tiffeneau (Soc. biol., T. 64, 1908) sensibilisierten Meerschweinchen subkutan und reinjizierten nach 17 Tagen intracerebral. Es kam zu schweren, meist tödlich endenden Krämpfen, die ausblieben, wenn die Reinjektion schon nach 7 Tagen vorgenommen wurde. Slatinéanu und Danielopolu (Soc. biol., T. 66, 1909) machten die gleiche Beobachtung nach Reinjektion von Bazillenmaterial; weiterhin stellten sie fest, daß sensibilisierte Tiere bei späterer Infektion mit Tuberkelbazillen mit frühzeitigen Allgemeinerscheinungen und beschleunigtem Krankheitsablauf reagieren. Orsini (Zeitschr. f. Immun., Bd. 5, 1910) behandelte Meerschweinchen intraperitoneal mit 2 ccm Tuberkulin vor und reinjizierte in gleicher Weise nach 30–60 Tagen. 67 Proz. seiner Versuchstiere reagierten anaphylaktisch und gingen im Spättode (nach 3—24 Stunden) zugrunde. Der Sektionsbefund ergab Hämorrhagien und Hyperämien im Abdomen. Sata (Zeitschr. f. Tuberkulose, Bd. 18, 1911) will durch intravenöse Vorbehandlung schon nach 8 Tagen Ueberempfindlichkeit gegen die subkutane Reinjektion erzielt haben. Seine Protokolle sind jedoch wenig beweisend. Mantoux und Perroy schließlich (Soc. biol., T. 70, 1911) geben an, daß nach subkutaner Injektion von 0,2–05 ccm Tuberkulin etwa vom 10. Tage ab positive Intrakutanreaktion zu erzielen sei. — Daß mit Tuberkelbazilleneiweiß und aus ihm gewonnenen Substanzen eine Sensibilisierung möglich ist, wird von keiner Seite bestritten. Auf die Anführung dieser Literatur kann daher verzichtet werden.

Aus den oben erörterten Gründen kommt aber auch diesem Befunde schon eine erhebliche theoretische Bedeutung zu. Es ist deshalb erforderlich, die Versuche noch auszubauen, sie insbesondere durch die Prüfung der passiven Uebertragbarkeit dieser Anaphylaxie, des Vorhandenseins oder Fehlens einer Antianaphylaxie und durch die Vornahme größerer Kontrollreihen mit eingeengter, unbeimpfter Glyzerinbouillon zu ergänzen. Wir sind in absehbarer Zeit leider nicht in der Lage, diese Versuche auszuführen.

Die große Anzahl der ausgeführten Tuberkulininjektionen bot uns Gelegenheit, noch einige andere Beobachtungen zu machen, die für die Frage nach den sensibilisierenden Eigenschaften nicht ohne Bedeutung sind.

1) Zunächst konnten wir feststellen, ob es durch subkutane Vorbehandlung normaler Meerschweinchen gelingt, die Tiere für eine 2—3 Wochen später folgende Intrakutanreaktion zu sensibilisieren. Der an 11 Meerschweinchen durchgeführte Versuch (subkutane Vorbehandlung mit 0,2 bzw. 0,5 ccm Tuberkulin, intrakutane Reinjektion mit 0,02 ccm) führte ausnahmslos zu negativem Ergebnis. In keinem Falle gelang es, durch subkutane Vorbehandlung tuberkulosefreier Meerschweinchen mit Tuberkulin Ueberempfindlichkeit gegenüber intrakutaner Reinjektion zu erzielen. Somit können wir die Angaben von Mantoux und Perroy (s. Anmerkung) nicht bestätigen.

2) Eine weitere Frage, die wir beantworten können, lautet: Gelingt es, durch wiederholte intrakutane Vorbehandlung gesunde Meerschweinchen so weit zu sensibilisieren, daß sie schließlich positive Intrakutanreaktionen geben? — Die positive Intrakutanreaktion äußert sich beim tuberkulösen Meerschweinchen in Form einer Kokarde: zentrales Extravasat, anämischer Hof und hyperämischer Ring. Treten derartige Reaktionen auch bei tuberkulosefreien, sensibilisierten Tieren auf? Unsere Versuchsergebnisse lehren: wohl ist es in einer ganzen Anzahl von Fällen zu Hyperämien und Entzündungserscheinungen, ja selbst zur Nekrosenbildung gekommen, niemals jedoch wurde eine typische Dreifarbenreaktion im Verlauf der Untersuchungen auf

Dosen von 0,02 ccm Tuberkulin beobachtet. Auch die beobachteten Entzündungserscheinungen dürfen nicht als Ausdruck einer Sensibilisierung gelten; denn sie traten mitunter schon bei den ersten Injektionen, mitunter erst gegen Ende der Behandlung auf und wechselten nicht selten mit reaktionslosem Verlauf der Injektionen ab.

3) Läßt sich eine typische Dreifarbenreaktion vielleicht auf andere Weise, durch Steigerung der Tuberkulindosis o. ä. erzeugen? Die Frage muß bejaht werden. Es kam gelegentlich vor, daß auf Einverleibung höherer als der üblichen Tuberkulindosen Dreifarbenreaktionen auftraten; nach intrakutaner Injektion von 0,04 und 0,08 ccm Tuberkulin wurden sie mehrfach beobachtet, offenbar ohne Zusammenhang mit der Art der Vorbehandlung. Die gleiche Erscheinung wurde jedoch mit ungefähr gleicher Häufigkeit beobachtet, wenn Dosen von 0,04 und 0,08 ccm unbeimpfter, eingeengter Glyzerinbouillon eingespritzt wurden. Es handelt sich somit bei den beobachteten Erscheinungen nicht um echte Tuberkulinreaktionen, sondern um Folgen der konzentrierten Nährlösungen, die bei empfindlichen Tieren gelegentlich auftreten. Ob die Hautveränderungen histologisch mit denjenigen bei spezifischer Tuberkulinreaktion übereinstimmten, haben wir nicht untersucht. Aeußerlich glichen sie der typischen Dreifarbenreaktion vollkommen.

4) Beim tuberkulös infizierten Menschen beobachtet man gelegentlich nach wiederholter Tuberkulinapplikation ein Aufflammen alter, schon abgeblaßter Intrakutanstellen. Aehnliche Beobachtungen haben wir an unseren tuberkulosefreien, mehrfach behandelten Meerschweinchen gemacht. Bei Tieren, die schon einige Tuberkulindosen erhalten hatten, rief mitunter die subkutane Einverleibung einer neuen Tuberkulinmenge nach 24 Stunden deutliche Entzündungserscheinungen an den alten Intrakutaninjektionsstellen hervor. Einen Grund für Auftreten oder Ausbleiben dieser Reaktionen konnten wir nicht feststellen; die reagierenden Tiere zeichneten sich durchaus nicht immer durch besonders starke Sensibilisierung im späteren Anaphylaxieversuch aus; bei genau gleicher Behandlung zeigten einzelne Tiere das Aufflammen, andere nicht. Wohl aber konnten wir durch Kontrollversuche mit unge-

impfter, eingeengter Glyzerinbouillon erweisen, daß die Reaktion mit den unveränderten Eiweißstoffen des Nährsubstrats nichts zu tun hat.

In der folgenden Tabelle sind die Protokolle der positiv reagierenden Tiere aufgeführt. Durch Fettdruck sind die Injektionen dargestellt, die zum Aufflammen der alten Stellen Anlaß gaben. — GB bedeutet Glyzerinbouillon, i = intrakutane Injektion mit 0,02 ccm, s = subkutane Injektion.

Tabelle V.

Tier No.	Behandlungstage und Art
20	14. I. i 16. I. i 21. I. i 24. I. i 27. I. i **30. I.** s **0,2** 3. II. i 10. II. i 14. II. s GB 0,2 **17. II.** s **0,2**
21	14. I. i 16. I. i 21. I. i 27. I. i **30. I.** s **0,2** 3. II. i 10. II. i 14. II. s GB 0,2 **17. II.** s **0,2**
18	3. I. i 6. I. s 0,2 9. I. i **12. I.** s **0,2** 15. I. i 20. I. i 24. I. i 27. I. i 30. I. s 0,2 3. II. i 10. 2. i 14. II. s BG 0,2 17. II. s 0,2
14	15. XII. s 05 29. XII. i **2. I.** s **0,2** 6. II. i 10. II. i 14. II. s GB 0,2 17. II. s 02
13	15. XII. s 0,5 29. XII. i 2. I. s 0,2 6. II. i 10. II. i 14. II. s GB 0,2 **17. II.** s **0,2**
39	16. I. s 0,5 30. I. i **3. II.** s **0,2** 10. II. i 14. II. s GB 0,2 **17. II.** s **0,2**
40	16. I. s 0,5 30. I. i **3. II.** s **0,2** 10. II. i 14. II. s GB 0,2 17. II. s 0,2
41	16. I. s 0,5 30. I. i 3. II. s 0,2 10. II. i 14. II. GB 0,2 17. II. s 0,2
144	23. IV. s 0,2 30. IV. i 0,04 **4. V.** s **0,2** 6. V. i 0,04 8. V. s 0,2 11. V. i 0,04 **15. V.** s **0,2**

Auch diese Versuchsergebnisse sprechen somit für die Möglichkeit einer gewissen Sensibilisierung tuberkulosefreier Meerschweinchen durch und gegen Tuberkulin.

5) In dem gleichen Sinne sprechen einige Einzelbeobachtungen über das Auftreten des Arthusschen Phänomens. Arthus hatte gefunden, daß Kaninchen häufig in der Weise ihre Ueberempfindlichkeit dokumentieren, daß sie auf die wiederholte subkutane Injektion des Antigens mit ausgedehnten ödematösen Infiltrationen an der Impfstelle reagieren. 4mal haben wir die gleiche Erscheinung an unseren Meerschweinchen beobachtet; meistens war sie von dem Aufflammen alter Intrakutannarben begleitet. An der subkutanen Einstichstelle hatte sich nach 24 Stunden ein breites, 2—3 cm langes Infiltrat gebildet, das sich im Verlauf von weiteren 24—48 Stunden

wieder zurückbildete. Es handelte sich um die in der vorhergehenden Tabelle aufgeführten Versuchstiere No. 39, 40, 41 und 144 und um die Injektionstage vom 17. II. und 15. V.

Somit bestätigen auch die an der Haut der Versuchstiere beobachteten Vorgänge die vorher beschriebenen Anaphylaxieversuche: es gelingt durch intensive, vielfach wiederholte Vorbehandlung mit Alttuberlin eine ganze Anzahl von Versuchstieren spezifisch zu sensibilisieren. Daß dies Ergebnis nicht regelmäßig bei allen Versuchen zu erzielen ist, liegt offenbar an der quantitativen oder qualitativen Minderwertigkeit des im Tuberkulin enthaltenen Antigens. Daß ein solches Antigen überhaupt vorhanden ist, glauben wir durch unsere Versuche und die erwähnten Resultate anderer Autoren nunmehr sichergestellt. Ob und wieweit es für die Deutung der spezifischen Tuberkulinreaktion beim Tuberkulösen herangezogen werden kann, ist eine ganz andere Frage, die durch die mitgeteilten Versuche nicht berührt wird.

Zusammenfassung.

Es gelingt, durch intensive, vielfach wiederholte Vorbehandlung mit Alttuberkulin Meerschweinchen, wenn auch nicht regelmäßig, gegen Tuberkulin zu sensibilisieren. Der Zustand spezifischer Ueberempfindlichkeit äußert sich

1) durch anaphylaktischen Shock nach intravenöser Reinjektion;
2) im Aufflammen alter Intrakutanstellen nach subkutaner Reinjektion;
3) im gelegentlichen Auftreten des Arthusschen Phänomens.

Dagegen gelang es nicht, durch subkutane oder intrakutane Vorbehandlung die Tiere so zu sensibilisieren, daß sie bei intrakutaner Reinjektion mit typischer Dreifarbenreaktion antworteten.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Innsbruck (Vorstand: Prof. Lode).]

Ueber die Adsorption von Bakterien und Agglutininen durch Suspensionen und Kolloide.

Von Dr. **Leo Bleyer**,
1. Assistent des Institutes.

(Eingegangen bei der Redaktion am 23. September 1921.)

Das Problem einer chemischen Deutung der Immunvorgänge insbesondere im Sinne der Kolloidchemie und der Versuch mit physikalisch-chemischen Methoden in ihren komplizierten Mechanismus Einblick zu gewinnen, um das Dunkel des biologischen Kräftespiels in greifbarere Beziehungen und Gesetze aufzuhellen, beschäftigt schon seit langem die Immunitätsforschung und brachte bereits eine schwer zu sichtende Fülle einschlägiger Arbeiten hervor. Unter anderem wurde auch das Phänomen der Adsorption als fundamentaler Faktor für das Zustandekommen und den Ablauf der Immunvorgänge erkannt und die verschiedensten Antikörper und Toxine hinsichtlich ihrer Adsorptionsbedingungen einer mannigfaltigen Prüfung unterzogen.

So z. B. gelang es v. Dungern mit Staphylokokkenaufschwemmungen, Hefepulver und Organzellensuspensionen verschiedenster Art Kaninchenserum komplementarm zu machen, während Knochenkohle, Hautpulver, Lykopodium und Kieselgur sich in Versuchen von Ehrlich und Sachs zur Aufnahme von Komplement ungeeignet erwiesen. Wilde vermochte mit lebenden und in der Hitze abgetöteten Bakterienaufschwemmungen, ferner mit roten Blutkörperchen und unlöslichen Eiweißstoffen (Aleuronat) Komplement zu adsorbieren und so verschiedene Sera ihrer bakteriziden und hämolytischen Eigenschaften zu berauben, wobei bei längerer Kontaktzeit und Bruttemperatur der Komplemententzug besser gelang als bei kurzem Reaktionskontakt und in der Kälte [in Analogie damit[1]), daß beim

1) Diese noch vielfach vertretene Ansicht scheint neueren Untersuchungen zufolge nicht mehr ganz zu Recht zu bestehen. Ueber Komplementbindung bei niederer und Eisschranktemperatur siehe Graetz, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 89 (1919), p. 284, und Wilk, Zeitschr. f. Bakt., Bd. 86 (1921), p. 169.

Hämolyseversuch die Komplementwirkung auch erst bei höherer Temperatur (ab 30°) voll eintritt]; mit Bolus alba und Tierkohle gelang die Adsorption nicht.

Landsteiner vermochte aus Tiersera Komplement und Normalhämolyse durch Digerierung mit Cholesterin, Protagon, Kaolin, Kasein und Lezithin auszuschalten, hingegen nicht mit Amylum, Serumeiweiß, Glykogen und Wittepepton. In weiteren Untersuchungen (1) prüfte er Serumeiweiß, Abrin- nud Rizinlösungen, Normal- und Immunhämagglutinine hinsichtlich ihrer Bindungsfähigkeit durch getrocknetes in 10-proz. Aufschwemmung verwendetes Fibrin, Kasein, ferner durch Seide und Stärke. Serumeiweiß wurde nicht adsorbiert, wohl aber, und zwar gut, die in den Rizin- und Abrinlösungen enthaltenen pflanzlichen Agglutinine für Gänseblutkörperchen, schon weniger gut Normalagglutinine tierischer Sera (Pferdeblut — Gänseblut) und endlich gar nicht die Immunagglutinine, so daß mit wachsender Spezifität die Bindungsfähigkeit der Agglutinine abnahm. v. Lingelsheim fällte aus frischen Blutseren mit einigen Tropfen filtrierten Karragenschleimes Eiweiß, Ambozeptoren, Komplement und für Meerschweinchen wirkende Serumgifte heraus. Nach längerem Stehen oder Erhitzen auf 55° blieb die Niederschlagsbildung aus und glaubte Lingelsheim damit eine einfache Differenzierungsmethode zwischen aktiven und inaktiven Sera gefunden zu haben. Andrejew (2) prüfte Rotzagglutinine gesunder und kranker Pferde und fand mit zunehmender Titerhöhe, also steigender Spezifität, eine abnehmende Bindungsfähigkeit durch Kasein, Kaolin, Baryumsulfat, Kieselgur und Knochenkohle; in gleicher Weise untersuchte er Typhus-, Paratyphus- und Ruhragglutinine und fand bei diesen inkonstante Adsorption durch obige Pulver. Alter und Karbolzusatz der Sera beeinflußte dieselbe dabei in keiner Weise.

Nicht nur in vitro, sondern auch in vivo wurde nach Adsorptionsmöglichkeiten gesucht. Friedberger und Salecker (3) konnten beim Meerschweinchen durch intravenöse Kaolinzufuhr Komplementschwund nachweisen, indes der Gehalt an Ambozeptoren unangetastet blieb. Neben mehr theoretischer Problemstellung wurde auch nach praktischer Verwertung des in vitro Erprobten gestrebt. So stellte Wolff (4) unter Benutzung der Wechselmannschen Modifikation ein Verfahren zur Unterscheidung der echten Wassermannschen Reaktion von der pseudopositiven nicht luetischer Leichensera auf, indem er nachwies, daß die lipoiden die Hämolysehemmung vortäuschenden Substanzen in unspezifischen Leichenseren durch Digerierung mit frisch präzipiertem Baryumsulfat in 5-proz. Suspension adsorbiert werden und so die früher positiv erscheinenden Sera nach Behandlung mit Baryumsulfat nunmehr negativ reagieren, während die echten luetischen Sera durch das Baryumsulfat in obiger Konzentration unbeeinflußt blieben. Michaelis (5) empfahl ein Anreicherungsverfahren für Typhusbazillen aus dem Stuhl durch Schütteln desselben mit Kaolin, das vorher mit verdünnter Salzsäure präpariert worden war, und fand bei der mit dem Zentrifugat vorgenommenen Platten-

aussaat eine Hemmung des Coliwachstums. Gutfeld (6), der seine Versuche einer Nachprüfung unterzog, kam jedoch zu einem ganz negativen Resultat und konnte keinerlei elektive Kaolinwirkung feststellen.

Folgende Versuche nun gliedern sich in zwei Abschnitte, von denen der erste kleinere mehr orientierenden Charakter trägt, und eine teilweise Nachprüfung der bereits von Bechhold (7) unternommenen Untersuchung über Bakterienadsorption mit etwas geänderter und erweiterter Technik darstellt, während der zweite sich mit der unspezifischen Adsorption von Immunagglutininen und dem weiteren Schicksal der Adsorbens-Agglutininverbindung befaßt.

I.

Vor Prüfung der Adsorbierbarkeit verschiedener Bakterien, von denen ich mich auf einige Haupttypen beschränkte, legte ich mir die Frage vor, inwieweit die Adsorption in Abhängigkeit von der Körnergröße stehen könnte, wobei ich von ganz groben Pulvern absah und nur feiner zerteilte Substanzen berücksichtigte. Ich ermittelte zu diesem Zweck auf mikrometrischem Wege die Durchmesser der Pulver, und zwar, wie aus Tabelle I ersichtlich, die beiden Grenzwerte und die

Tabelle I.

Adsorbentien	Durchmesser			
	Maximalwert	Minimalwert	Mittelwert	Quadrat des Mittels
Tierkohle	45 μ	1 μ	9 μ	81 μ²
Bolus alba	60 μ	1,5 μ	15 μ	225 μ²
Kalziumoxalat	30 μ	1,5 μ	8 μ	64 μ²
Baryumsulfat	3 μ	0,75 μ	1,5 μ	2 μ²

am häufigsten zu sehende Größe als Mittelwert. Da die Gestalt der Partikelchen auch nicht annähernd kugelförmig war, sondern dieselben eine sehr unregelmäßige Begrenzung zeigten, wurde als Durchmesser der einzelnen Körner das Mittel zwischen dem kürzesten und längsten genommen und so auf Grund der Messung vieler Einzelteilchen obige Berechnung vorgenommen. Infolge dieser Formvariabilität verhalten sich die Teilchenoberflächen natürlich zueinander nicht genau wie die Quadrate obiger Durchmesser und ist die mikrometrische Schätzung nur eine sehr approximative. $BaSO_4$ erwies sich am kleinkörnigsten, Tierkohle (von der Art der im Kriege gegen Typhus und Ruhr angewendeten) und Kalziumoxalat (selbst

hergestellt aus konzentriertem Gipswasser und oxalsaurem Ammon mit nachherigem Waschen durch mehrmaliges Dekantieren und Eindampfen) hielten die Mitte, Bolus alba bot die größten Dimensionen. Nach dieser Messung und orientierenden Vorexperimenten schritt ich an die Ausführung der eigentlichen Versuche, deren Technik sich folgendermaßen gestaltete: 1 ccm Bakterienemulsion mit 4 ccm einer ca. 2-proz. Pulveraufschwemmung versetzt kam auf 5—10 Minuten in den elektrischen Schüttelapparat (Schüttelzeit wurde bei den einzelnen Bakterien, je nach ihrer leichten oder schweren Zerteilbarkeit, verschieden lang gewählt) und wurde dann 2mal durch dasselbe gehärtete Filter filtriert. Von dem Filtrat wurde eine 10-fache Verdünnung (0,5 : 5,0) hergestellt und davon genau 0,5 ccm zur Aussaat auf Agarplatten verwendet, mit deren Kolonienzählung nach 24-stünd. Verweilen im Brutschrank begonnen wurde. Die in folgenden Tabellen mitgeteilten Keimzahlen stellen den Mittelwert aus 20 gezählten mikroskopischen Gesichtsfeldern umgerechnet auf die ganze Platte, somit deren gesamte Kolonienzahl dar. Anfangs wurden 2 Kontrollen angelegt, um den Einfluß der Filtration oder Zentrifugierung allein auf die Dichte der Bakterienemulsion zu prüfen. K_1 = unfiltrierte, K_2 = 2mal durch gehärtetes Filter geschickte Kontrollaufschwemmung, welch letztere für die Berechnung der absoluten und prozentuellen Adsorption als Grundlage angenommen wurde. E_f = Keimzahl der nach Pulverbehandlung gewonnenen Filtrate.

Bei der Auswahl der Bakterien war einerseits der Besitz von einer größeren Gruppe zukommenden gemeinsamen morphologischen Merkmalen maßgebend, andererseits war leichte Züchtbarkeit und Wachstum in gut abgegrenzten Kolonien für eine genaue Plattenzählung unerläßlich. Ich wählte als Vertreter der Typhus-Coligruppe den Bac. paratyphi A (Schüttelzeit 5 Minuten), für die Kokkengruppe den Staphylococcus pyogenes aureus (Stammemulsion kam zuerst allein auf 20 Minuten in den Schüttelapparat, hernach Prüfung der Haufenzerteilung durch gefärbte Ausstriche, und jetzt erst Versetzen mit den Pulveraufschwemmungen und 10 Minuten Verweilen im Schüttelapparat), und als Kapselbakterium den Bac. pneumoniae Friedländer, der auch wegen der schleimigen

Tabelle II.

Adsorbens	Paratyphus A					Staphylokokken				
	K_1	K_2	Ef	Absolut. Keimverlust	Proz. Keimverlust	K_1	K_2	Ef	Absol. Keimverlust	Proz. Keimverlust
Kohle	252 000	107 000	θ	107 000	100 %	69 000	34 000	θ	34 000	100 %
$BaSO_4$			45 600	61 400	58 „			12 000	22 000	65 „
Kalziumoxalat	150 000	54 000	θ	54 000	100 „	162 000	39 000	θ	39 000	100 „
Bolus alba			10 500	44 500	81 „			14	38 986	99,9 „
	Bac. pneumoniae Friedländer					Bac. pneumoniae Friedländer				
Kohle	.	39 000	θ	39 000	100 %	.	60 000	θ	60 000	100 %
$BaSO_4$			„	„	„			28	59 972	99,9 „
Kalziumoxalat			„	„	„			θ	60 000	100 „
Bolus alba			„	„	„			θ	„	„

Beschaffenheit seiner Vegetationsmasse von Interesse erschien. Die Betrachtung der Tabelle II lehrt nun zunächst, daß der Einfluß der bloßen Filtration allein auf die Dichte der Bakterienemulsion ein ganz erheblicher ist. So sank bei Para-A in dem einen Fall der Keimgehalt von K_1 zu K_2 auf zirka die Hälfte, in dem anderen sogar auf ein Drittel des ursprünglichen, bei dem Staphylokokkenversuch auf die Hälfte und ein Viertel. Von den Adsorbentien weisen Kohle und Kalziumoxalat 100 Proz. Adsorption auf, dann folgt Bolus alba und zuletzt $BaSO_4$ trotz seiner Feinkörnigkeit; ein Parallelismus zwischen Teilchengröße an sich und Adsorptionsfähigkeit innerhalb des in Verwendung gekommenen Spielraumes von 1,5—15 μ ist in keiner Weise zu ersehen. Wertet man die Körnergröße nach ihrer Beziehung zur Oberflächenvermehrung (in dem Sinne, daß ein und dasselbe kompakt gedachte Massevolum durch eine feine Zerteilung eine größere Flächenentwicklung erfährt als durch eine grobe), so ist bei Zugrundelegung gleicher Gewichtsprozente wie in vorliegendem Fall auch das spezifische Gewicht zu berücksichtigen, indem eben von einer leichten Substanz zur Erzielung des gewünschten Gewichtes mehr Masse (und damit Volum) genommen werden muß, als von einer leichten, in unserem konkreten Versuch also die 2-proz. Kohleaufschwemmung vermöge ihres geringen Gewichtes ein viel größeres Volum und Oberflächenentfaltung besitzt als die ebenfalls 2-proz., aber spezifisch sehr schwere Baryumsulfatsuspension. Allerdings dürfte, wie noch

später zu erwähnen sein wird, bei der Tierkohle ihr geringes Gewicht nicht das einzige ausschlaggebende Moment sein. Beim Vergleich der Adsorbierbarkeit der Bakterien untereinander (durch Bolus und $BaSO_4$) fällt auf die komplette Adsorption von Bac. Friedländer sowohl aus dünner als auch dichterer Emulsion; es liegt dabei nahe, daran zu denken, daß die den Bazillus umgebende Schleimhülle im Sinne einer Kittsubstanz bei der Anlagerung zwischen Pulverteilchen und Mikroorganismus wirkt und infolge ihrer zähen klebrigen Konsistenz ein Haftenbleiben an der Pulveroberfläche besonders begünstigt. Staph. pyogenes zeigt gegenüber Para-A eine etwas höhere prozentuelle Bindungsfähigkeit, und zwar beträgt die Differenz zugunsten des ersteren bei $BaSO_4$ 7 Proz., bei Bolus alba rund 19 Proz.; möglich, daß die Kleinheit der Kokken dabei eine Rolle spielt.

Bei kritischer Auswertung dieser Adsorptionsresultate drängt sich die Frage auf, inwieweit dieselben tatsächlicher Ausdruck der adsorbierenden Kraft der Pulversuspensionen sind oder ob nicht der Vorgang wenigstens teilweise als Folge einer Filterporenverstopfung aufzufassen sei, die man ja auch bei Auswahl relativ dünner Aufschwemmungen, wie es die angewandten 2-prozentigen sind, nicht ganz vermeiden kann. Um einen Einblick in die reine Leistung der Pulver zu gewinnen, benutzte ich jetzt behufs Trennung zwischen ersteren und dem Suspensionsmittel die elektrische Zentrifuge. Nach gleicher Vorbehandlung der Gemische, wie früher geschildert, wurden sie statt auf Filter in die Zentrifuge gebracht und zuerst 10 Minuten, dann die über dem Bodensatz befindliche Flüssigkeitsschicht nochmals 5 Minuten zentrifugiert und mit 0,1 ccm der 10-fachen Verdünnung (bei deren Herstellung nur vom obersten Teil der Flüssigkeit abpipettiert wurde) wie früher die Plattenaussaat gemacht. K_2 = Keimzahl der Ausgangsemulsion nach zweimaliger Zentrifugierung. E_z = Keimzahl der Pulverabgüsse. Mit Zugrundelegung von K_2 bei Berechnung der Adsorptionsgröße ist die Wirkung der Zentrifugalkraft für sich allein auf die Bakteriendichte bereits in Abzug gebracht. Tabelle III zeigt nun zunächst, daß, wie zu erwarten war, die Zentrifugalkraft die Dichte der Stammemulsion ganz gewaltig vermindert, bei Para-A ungefähr um

Tabelle III.

Adsorbens	Para-A					Staphylococcus pyogenes				
	K_1	K_2	E_z	Absol. Keim-verlust	Proz. Keim-verlust	K_1	K_2	E_z	Absol. Keim-verlust	Proz. Keim-verlust
Bolus	116 000	48 000	23 500	24 500	51 %	200 000	30 000	450	29 550	98 %
$BaSO_4$			17 000	31 000	64 „			19 000	11 000	36 „
Kalzium-oxalat			θ	48 000	100 „			θ	30 000	100 „

Adsorbens	Bac. Friedländer				Para-A				Staphyloc. pyogenes			
	K_2	E_z	Abs. Keim-verl.	Proz. Keim-verl.	K_2	E_z	Abs. Keim-verl.	Proz. Keim-verl.	K_2	E_z	Abs. Keim-verl.	Proz. Keim-verl.
Bolus	90 000	18 000	72 000	80 %	49 000	17 100	32 000	65 %	21 000	θ	21 000	100 %
$BaSO_4$		12	98 088	99,9 „		22 600	26 500	54 „		5 000	16 000	76 „
Kalzium-oxalat		θ	90 000	100 „		θ	49 100	100 „		θ	21 000	100 „

die Hälfte, bei Staph. pyogenes sogar um $^5/_6$ des ursprünglichen Keimgehaltes, so daß die Leistung der Pulver daneben als sehr bescheiden imponiert. Wie früher, weist Kalziumoxalat überall komplette Adsorption auf, Bolus alba und Baryumsulfat schwanken beide bei Para-A in ihrer Wirkungsintensität (ersteres zwischen 65—51 Proz., letzteres zwischen 64—54 Proz.), bei Staph. überwiegt die Bolusadsorption in beiden Fällen analog Tabelle II ganz entschieden die inkonstante Adsorption des $BaSO_4$ (36—76 Proz.), bei Bac. Friedländer entfaltet letzteres fast kompletten Keimentzug, indes Bolus alba nur 80 Proz. aufweist. Die Tierkohle erwies sich bei mehrfachen Versuchen als schlecht zentrifugabel, indem einerseits der gebildete Bodensatz infolge seiner Lockerheit ein Abgießen oder Abpipettieren der darüber stehenden Flüssigkeit stets beeinträchtigte und andererseits am Flüssigkeitsspiegel immer eine dünne Kohleschicht angesammelt blieb; sie konnte daher bei dieser Methode nicht in Verwendung kommen.

Bei Vergleich von Tabelle III mit Tabelle II erhellt die nicht ganz erwartete Tatsache, daß die Zentrifugierungsmethode im allgemeinen keine wesentlich niedrigeren Adsorptionswerte liefert als die Filtrationsmethode und beide als ziemlich gleichwertig erscheinen, das Moment der eventuellen Filterporenverstopfung also nicht sehr hoch veranschlagt und bei dünneren

Pulversuspensionen vernachlässigt werden darf. Nur der Bolusabguß liefert bei Para-A in Tabelle III beträchtlich niedrigere Werte als in Tabelle II, bei Bac. Friedländer in Tabelle III ist die größere Keimdichte von K_2 zu berücksichtigen, im übrigen liefert die Zentrifugierungsmethode sogar etwas höhere Prozentzahlen. Aus beiden Tabellen kann man eine leichtere Adsorbierbarkeit der Kokken (besonders durch Bolus alba) gegenüber den gewöhnlichen Stäbchen herauslesen, die sich anscheinend der von der Pulveroberfläche ausgehenden Attraktionswirkung am wenigsten empfänglich zeigen. Bac. Friedländer zeigt bei Berücksichtigung des größeren Keimgehaltes von K_2 in Tabelle III immerhin die beste Anlagerungsfähigkeit. Eine konstante Beziehung zwischen Körnergröße an sich und Adsorptionsgröße läßt sich auch diesmal nicht ersehen.

Tabelle IV.

Adsorbens	Paratyphus A				Staphyloc. pyogenes				Bac. Friedländer			
	K_2	E_z	Absol. Keim-verlust	Proz. Keim-verl.	K_2	E_z	Absol. Keim-verlust	Proz. Keim-verl.	K_2	E_z	Absol. Keim-verlust	Proz. Keim-verl.
Bolus	152 000	97 800	54 200	36 %		509 000	32 000	5 %		18 000	102 000	85 %
$BaSO_4$		99 700	52 300	34 „	541 000	537 000	4 000	0,7 „	120 000	27 000	93 000	77 „
Kalzium-oxalat	280 000	61 000	219 000	78 „		108 000	433 000	80 „		θ	120 000	100 „
Kohle	221 000	30(E_f)	120 970	99,9 „	237 500	θ	237 500	100 „	270 000	4	269 996	99.9 „

Es schien mir noch eine Orientierung über die Adsorptionsverhältnisse bei sehr dichten Bakterienaufschwemmungen von Interesse, worüber Tabelle IV Aufschluß gibt. Es ergab sich, daß bei zunehmender Dichte der Emulsionen die Adsorption prozentual absinkt, um teilweise dem Nullpunkt zuzustreben (so versagten bei der sehr dichten Staph.-Aufschwemmung Bolus und Baryumsulfat praktisch genommen gänzlich). Dabei kann die absolute Adsorption trotz Abnahme der relativen noch ziemlich hoch bleiben (Para-A—Bolus, $BaSO_4$ und Kalziumoxalat), bis bei ganz dichten Aufschwemmungen auch sie schließlich absinkt (Staph.—Bolus und $BaSO_4$). Eine Ueberladung der Pulverteilchen, besonders sehr kleiner Körner ($BaSO_4$), mit den Bakterien scheint deren Anlagerung zu beeinträchtigen und eine Abstoßung derselben zur Folge zu haben. Vergleicht man die Adsorbentien in ihrem Versagen mit-

einander, so fällt auf, daß die Tierkohle sich bei den dichten Emulsionen fast ebensogut bewährt wie früher bei den dünnen, und sich somit dem Kalziumoxalat überlegen zeigt, welches in Tabelle IV ein mäßiges, aber immerhin deutliches Absinken erkennen läßt. Bolus unterliegt starkem und Baryumsulfat noch stärkerem Rückgang der prozentualen Adsorption.

In Zusammenfassung der bisherigen Versuchsresultate läßt sich folgendes orientierendes Ergebnis gewinnen:

1) Bereits dünne Pulveraufschwemmungen vermögen Bakterien in beträchtlichem Grade zu adsorbieren, insbesondere entspricht die therapeutisch verwendete Tierkohle vorzüglich.

2) Innerhalb eines durchschnittlichen Teilchendurchmessers von 1,5—15 μ besteht keine feste Relation zwischen Körnergröße für sich allein genommen und der Adsorptionsleistung. Hingegen ist die möglichst große Oberflächenentwicklung in suspendiertem Zustand mit der von ihr ausgehenden Attraktionswirkung als ein ausschlaggebendes Moment anzusehen, und nur insofern die Teilchengröße die Gesamtoberfläche beeinflußt, ist sie von Belang. So entscheidet bei Bolus und Kalziumoxalat, die in ihrem Gewicht voneinander nicht bedeutend differieren und auf der Basis gleicher Gewichtsprozente annähernd dasselbe Massevolum besäßen (theoretisch kompakt und unzerteilt gedacht), die feinere Dispersion in aufgeschwemmtem Zustand zugunsten des letzteren. Es sei noch auf zwei weitere Momente verwiesen, die allerdings keiner direkten mikroskopischen Einsicht zugänglich sind: auf die sogenannte „innere Oberfläche“ im Sinne von Porosität (Tierkohle!), durch welche die Gesamtoberfläche eine bedeutende Vermehrung erfahren kann, und auf die Beschaffenheit der Körneroberfläche, indem einerseits durch deren Furchung und reliefartigen Gestaltung ebenfalls weitere Grenzfläche gewonnen wird, und andererseits, grob mechanisch gesprochen, eine rauhe Begrenzungsfläche das Haftenbleiben korpuskulärer Elemente eher begünstigt als eine glatte, somit das Ausmaß dieser Rauheit und Furchung an den Pulverkörnern für die Anlagerung von Bakterien vielleicht auch von Belang ist.

3) Irgendwelche chemische Affinitäten zwischen den Adsorbentien und den Bakterien im Sinne konstanter Gesetzmäßigkeit sind durch obige Versuche nicht zu vermuten.

4) Von den geprüften Bakterientypen ist Bac. pneumoniae Friedländer am besten, Para A am wenigsten adsorbierbar, Staph. pyogenes steht in der Mitte. Bei Bac. Friedländer scheint die Schleimkapsel, bei den Kokken ihre Kleinheit prädisponierend zu wirken.

5) Mit zunehmender Dichte der Bakterienemulsion sinkt, mit Ausnahme der Tierkohle, bei den übrigen Adsorbentien die Adsorption prozentual ab.

II.

Wie bereits eingangs erwähnt, konstatierte schon Landsteiner (1) die Adsorbierbarkeit von Normalhämagglutininen durch Proteine und berichteten Eisler (8) und Andrejew (2) über die Bindungsfähigkeit von Typhus- und Ruhragglutininen durch Kohle, Kieselgur und Kaolin. Die Immunsera, die homologen Bakterien gegenüber eine gewisse exklusive Spezifität bewahrten, schienen anorganischen Suspensionen gegenüber ihren Elektivismus verloren zu haben. Am Schlusse folgender Untersuchung wird dieser Punkt noch einer kurzen Erörterung unterzogen und auf den fundamentalen Unterschied zwischen beiden Prozessen, der spezifischen Bindung durch Bakterien und der nicht spezifischen durch nachstehende Adsorbentien, hingewiesen werden. Ich untersuchte nun die Agglutininaufnahme 1) durch Suspensionen, 2) durch kolloidale Lösungen.

Ad 1.

Als Suspensionen dienten mir 10-proz. Aufschwemmungen von Tierkohle (derselben Art wie im I. Teil verwendet), Kalziumoxalat, Bolus alba, Kaolin, $BaSO_4$, Kieselgur und Kasein (nach Hammarsten), die āā partes mit den einzelnen Serumverdünnungen versetzt und nach einstündigem Verweilen der Gemische (unter oftmaligem Durchschütteln) in der Brutzelle bei 37° abzentrifugiert wurden, worauf Filtration der Abgüsse durch weiche Filter und die Austitrierung folgten. Das Kohlegemisch wurde ohne vorherige Zentrifugierung auf gehärtetes Filter gebracht, ebenso die Kontrollserumverdünnung. Zur Wahl höherer Prozentsätze der Pulveraufschwemmungen entschloß ich mich, nachdem Vorversuche mit 2-proz. Suspensionen ein vollkommen negatives Resultat ergeben hatten.

Die Ablesung des Agglutinationsergebnisses nahm ich 5 Stunden nachher vor, die Technik war die der makroskopischen Methode unter Benutzung 24-stündiger Schrägagarkulturen und Beschleunigung der Ausflockung durch Bruttemperatur. Das Zeichen ++ bedeutet komplette, + = inkomplette, aber noch deutliche, ± = eben noch angedeutete, nur bei Lupenbetrachtung gut sichtbare Ausflockung, — = negatives Resultat. Die verwendeten Immunsera (zum größten Teil Ziegensera) stammten vom Wiener serotherapeutischen Institut und waren alle schon längere Zeit auf Lager; die davon bereiteten und im Eisschrank in Vorrat gehaltenen Ausgangsverdünnungen bekamen einen 0,5-proz. Karbolzusatz.

Tabelle V ergibt nun folgende Einsicht: von den angewandten Adsorbentien übertraf die Tierkohle alle anderen bei weitem an Konstanz und Intensität der Wirkung. 7mal adsorbierte sie komplett, bei Typhusserum No. 1 fast komplett (in den ersten 3 Verdünnungen nur noch angedeutete Agglutination), bei Typhusserum No. 2 zeigte das Kohlefiltrat nur in den 3 letzten Verdünnungen eine merkliche Abschwächung gegenüber der Kontrolle. Calciumoxalat und Kasein versagten in allen Fällen gänzlich, Kaolin ebenfalls, mit Ausnahme von Para A-Serum No. 2 (Reduktion auf $^1/_4$ Titer). Bolus alba adsorbierte 2mal Dysenterieagglutinin vollständig, 1mal Para B-Agglutinin (No. 1) auf ungefähr die Hälfte und 1mal Cholera-Agglutinin (No. 2) auf $^1/_4$ Titer. Kieselgur reduzierte bei Dysenterieserum No. 2 und Para A-Serum No. 2 auf zirka die Hälfte, bei Dysenterieserum No. 1 auf $^2/_3$ des Titers; bei allen übrigen Sera blieb es wirkungslos. Baryumsulfat verursachte bei Dysenterieserum No. 1 eine Titersenkung auf $^2/_3$, bei Dysenterieserum No. 2 auf rund die Hälfte der ursprünglichen Höhe, bei Para B No. 2 auf ein Viertel derselben, und Typhusserum No. 2 eine leichte Abschwächung der Agglutination von der 2. Verdünnungsstufe ab, die in den beiden letzten deutlich ausgeprägt ist. An die glänzende Kohlewirkung reiht sich also in beträchtlicher Entfernung Bolus alba; Kieselgur und Baryumsulfat adsorbierten überhaupt nie komplett, sondern nur unvollständig und vereinzelt; ihre positive Leistung erscheint gegenüber den Versagern gering und inkonstant.

Tabelle V.

Choleraserum No. 1						
Verd.	Kontr.	Kohle	Kalz.-Oxalat	Kieselgur	Bolus	$BaSO_4$
1:200	++	—	++	++	++	++
1:400	++	—	++	++	++	++
1:800	++	—	++	++	++	++
1:1600	++	—	++	++	++	++
1:3200	++	—	++	++	++	++
1:6400	+	—	+	+	+	+

Typhusserum No. 1						
Verd.	Kontr.	Kohle	$BaSO_4$	Kalz.-Oxalat	Bolus	Kieselgur
1:100	++	±	++	++	++	++
1:200	++	±	++	++	++	++
1:400	++	±	++	++	++	++
1:800	++	—	++	++	++	++
1:1600	++	—	++	++	++	++
1:3200	+	—	+	+	+	+

Dysenterie Shiga-Kruse No. 1						
Verd.	Kontr.	Kohle	Kalz.-Oxalat	Kieselgur	Bolus	$BaSO_4$
1:100	++	—	++	++	—	++
1:200	+	—	+	+	—	+
1:300	+	—	+	+	—	+
1:400	+	—	+	±	—	+
1:600	±	—	±	—	—	—
1:800	—	—	—	—	—	—

Paratyphus B No. 1						
Verd.	Kontr.	Kohle	Kalz.-Oxalat	Bolus	$BaSO_4$	Kieselgur
1:100	++	—	++	++	++	++
1:200	++	—	++	++	++	++
1:400	++	—	++	++	++	++
1:800	++	—	++	+	++	++
1:1600	++	—	++	±	++	++
1:3200	+	—	+	—	+	+

Dysenterie Shiga-Kruse No. 2							
Verd.	Kontr.	Kohle	Kalz.-Oxalat	Bolus	$BaSO_4$	Kieselgur	Kasein
1:100	++	—	++	—	++	++	++
1:200	++	—	++	—	+	+	++
1:300	++	—	++	—	±	±	++
1:400	++	—	++	—	—	±	++
1:600	+	—	+	—	—	—	+
1:800	±	—	±	—	—	—	±

Paratyphus B No. 2							
Verd.	Kontr.	Kohle	Kalz.-Oxalat	Kaolin	$BaSO_4$	Kieselgur	Kasein
1:160	++	—	++	++	++	++	++
1:320	++	—	++	++	++	++	++
1:640	++	—	++	++	++	++	++
1:1280	++	—	++	++	++	++	++
1:2560	++	—	++	++	+	++	++
1:5120	+	—	+	+	±	+	+

Typhusserum No. 2							
Verd.	Kontr.	Kohle	Kalz.-Oxalat	Bolus	$BaSO_4$	Kieselgur	Kasein
1:80	++	++	++	++	++	++	++
1:160	++	++	++	++	+	++	++
1:320	++	++	++	++	+	++	++
1:640	++	+	++	++	+	++	++
1:1280	++	+	++	+	±	++	++
1:2560	+	±	+	+	±	±	+

Choleraserum No. 2							
Verd.	Kontr.	Kohle	Kalz.-Oxalat	Bolus	$BaSO_4$	Kieselgur	Kasein
1:100	++	—	++	++	++	++	++
1:320	++	—	++	+	++	++	++
1:640	++	—	++	+	++	++	++
1:1280	++	—	++	+	++	++	++
1:2560	++	—	++	—	++	++	++
1:5120	±	—	±	—	±	±	±

Paratyphus A No. 1							
Verd.	Kontr.	Kohle	Kalz.	Kaolin	$BaSO_4$	Kieselgur	Kasein
1:100	++	—	++	++	++	++	++
1:200	++	—	++	++	++	++	++
1:400	++	—	++	++	++	++	++
1:800	++	—	++	++	++	++	++
1:1600	++	—	++	++	++	++	++
1:3200	++	—	++	++	++	++	++

Paratyphus No. 2					Cholera No. 2	
Verd.	Kontr.	Kaolin	$BaSO_4$	Kieselgur	Kontr.	Kaolin
1:100	++	+	±	++	++	++
1:200	+	—	—	+	++	++
1:400	+	—	—	—	++	++
1:800	—	—	—	—	++	++
1:1600	—	—	—	—	++	++
1:3200	—	—	—	—	++	++

Vergleichen wir die einzelnen Sera untereinander, so fällt sofort die schwere Adsorbierbarkeit des Typhus- und die leichte des Dysenterie- und Para B No. 2-Agglutinins auf. Ferner, daß Sera qualitativ gleichen Agglutiningehaltes keine ganz identischen Adsorptionsbilder bieten, um etwa sagen zu können, daß jedem Immunagglutinin ein bestimmter Adsorptionstypus entspricht. So differieren deutlich die Cholerasera gegenüber Bolus alba, die beiden Typhussera gegenüber Kohle und $BaSO_4$, und die Para A-Sera in bezug auf Kaolin, $BaSO_4$ und Kieselgur. Möglicherweise spielen dabei Schwankungen in der Zusammensetzung der Sera eine Rolle, die in der Individualität der serumspendenden Tiere begründet liegen. Hinsichtlich der leichten Adsorbierbarkeit bei den Dysenterieseren und Para A No. 2-Serum sei deren niedriger Titer hervorgehoben (bei Dys. No. 1 nur bis 1:600, bei Dys. No. 2 bis 1:800, und bei Para No. 2 bis 1:400); insofern die Titerhöhe eines Immunserums als Maßstab für seine Spezifität gelten darf, kann an einen Zusammenhang zwischen dieser und der Adsorptionsfähigkeit in dem Sinne gedacht werden, daß beide Eigenschaften zueinander in umgekehrtem Verhältnis stehen (je hochwertiger ein Serum, desto geringer seine Tendenz zur Agglutininabgabe an Adsorbentien), ein Moment, auf das bereits Landsteiner (1) in seiner Arbeit über die Bindungsfähigkeit von Normal- und Immunhämagglutininen durch Proteine hinwies.

Ad 2.

Von der Vorstellung ausgehend, daß die Leistung eines Adsorbens im wesentlichen eine Funktion seiner Oberflächenentfaltung in suspendiertem Zustand ist, gelangt man zu der Annahme, daß kolloidale Lösungen infolge ihrer ungemein feinen ultramikroskopischen Dispersion bloße Suspensionen an Adsorptionskraft übertreffen müßten. Zur Prüfung derselben ist genau wie bei den Pulvern die Entfernung des Adsorbens nach erfolgter Digerierung erforderlich, bei den Kolloiden also ihre Ausscheidung als Gel, und zwar bewährte sich auf Grund mehrfacher Vorversuche die Ueberführung in den Gelzustand durch Elektrolytfällung, deren nähere Details weiter unten beschrieben werden.

Um dem Einwand zu entgehen, daß der dabei entstehende Niederschlag eben an und für sich adsorbierend wirkt und eine Bindung in kolloidalem Zustand nur vorgetäuscht sei, untersuchte ich zunächst die Einwirkung von Substanzen in statu nascendi aus echten Lösungen auf den Agglutiningehalt meiner Immunsera. Als massive Niederschlagsbildungen wählte ich $Al_2(OH)_6$-, Fe_2O_3- und AgCl-Niederschläge, von denen der erste zugleich gallertige Beschaffenheit aufweist, als feine $BaSO_4$ und Kalziumoxalat. Die Niederschläge wurden so erzeugt, daß

auf 0,5 Serumverd. + 0,5	Alumen kal. konz.	der Zusatz von 1,0	10 Proz. Na_2CO_3
	10 Proz. $BaCl_2$		5 „ Na_2SO_4
	Fe_2Cl_6 konz.		10 „ Na_2CO_3
	Gipswasser konz.		oxalsaures Ammon
	$^1/_2$ n. $AgNO_3$		20 Proz. NaCl

kam, worauf die Niederschläge sofort abzentrifugiert und die Abgüsse austitriert wurden. Tabelle VI liefert nachstehendes

Tabelle VI.

Choleraserum (2)						
Verd.	Kontrolle	$Al(OH)_3$	AgCl	$BaSO_4$	Kalzium-oxalat	Fe_2O_3
1:140	++	++	++	++	++	+
1:280	++	++	++	++	++	+
1:560	++	++	++	++	++	++
1:1120	++	++	++	++	++	+
1:2240	++	++	++	++	++	+
1:4480	++	++	±	±	++	+

Typhusserum (2)						
Verd.	Kontrolle	$Al(OH)_3$	AgCl	$BaSO_4$	Kalzium-oxalat	Fe_2O_3
1:200	++	++	++	++	++	+
1:400	++	++	++	++	++	++
1:800	++	++	++	++	++	++
1:1600	++	++	++	+	++	++
1:3200	++	++	++	+	++	++
1:6400	+	+	+	±	+	++

Paratyphus A (1)-Serum						
Verd.	Kontrolle	$Al(OH)_3$	AgCl	$BaSO_4$	Kalzium-oxalat	Fe_2O_3
1:200	++	.	++	— —	++	+
1:400	++	+	++	— —	++	+
1:800	++	+	++	— —	++	+
1:1600	++	+	++	— —	++	++
1:3200	++	++	++	— —	++	++
1:6400	+	+	+	— —	+	++

Paratyphus B (2)-Serum						
Verd.	Kontrolle	$Al(OH)_3$	AgCl	$BaSO_4$	Kalzium-oxalat	Fe_2O_3
1:120	++	++	++	++	++	++
1:240	++	++	++	++	++	++
1:480	++	++	++	++	++	++
1:960	++	++	++	++	++	++
1:1920	++	++	++	++	++	++
1:3840	+	+	+	+	+	+

Ergebnis: Calciumoxalat und $Al_2(OH)_6$[1]) in statu nascendi beeinflußten den Agglutiningehalt in keiner Weise, AgCl bewirkte nur bei Choleraserum eine Abschwächung in der letzten Verdünnungsstufe. $BaSO_4$ adsorbierte bei Paratyphus A-Serum 2mal komplett, bei Choleraserum verursachte es in der letzten, bei Typhusserum in den 3 letzten Verdünnungen eine merkliche Abschwächung im Vergleich zur Kontrolle. Fe_2O_3 weist bei Cholera in der ganzen Verdünnungsreihe eine leichte Hemmung auf, ohne jedoch die Titerhöhe zu erniedrigen, sonst blieb es überall erfolglos. Die den späteren Kolloidfällungen einigermaßen analogen $Al_2(OH)_6$- und Fe_2O_3-Niederschlagsbildungen adsorbierten demnach so minimal, daß wir eine eventuell mitreißende Wirkung bei den ersteren vernachlässigen können. $BaSO_4$ frisch präzipitiert kann mit dem späteren Ausfällungsprozeß der Hydrosole nicht ganz verglichen werden; während diese nämlich verhältnismäßig grob ausflockten und rasch zu Boden sanken, verweilte $BaSO_4$ in frischer Bereitung länger in einem für adsorptive Wirkung günstigen Zustand feiner Dispersion und sedimentierte sehr langsam, stellt demnach nach Abklingen einer gar nicht in sichtbare Erscheinung tretenden kolloidalen Uebergangsphase eine Mittelstufe zwischen kolloidaler Zerteilung und grober Suspension dar.

Eine Adsorption noch in kolloidem Zustand scheint damit für folgende Versuche wahrscheinlich gemacht. Ich wählte als elektropositive Hydrosole Ferrum hydrooxydatum dialysatum und Elektroferrol[2]) (0,5 % Fe), als elektronegative das gewöhnliche im Handel befindliche und gegen septische Prozesse angewandte, auf chemischem Wege gewonnene Kollargol und das Elektrokollargol[2]) (0,6 % Ag); als Emulsionskolloid diente Kaseosan[2]) (5 % Kasein). Die Versuchstechnik gestaltete sich folgendermaßen: Serumverdünnung + Kolloid zu gleichen Teilen wurden teils 1 Stunde bei 37°, teils nur 2—3 Minuten bei Zimmertemperatur (15°) miteinander digeriert und dann der Sol- in den Gelzustand übergeführt. Bei Ferrum hydro-

1) Leerkontrollen (Abgüsse aus Alum. kal. + Na_2CO_3 ohne Serumzusatz hergestellt) zeigten keinerlei Agglutination.

2) Von der Firma Heyden in Radebeul-Dresden kostenlos überlassen, wofür hiermit bestens gedankt sei.

oxydatum dial. geschah dies durch Zusatz von 0,4 ccm einer 10-proz. NaCl-Lösung, bei allen übrigen Präparaten durch 0,3—0,4 ccm n/10 HCl. Nach erfolgter Abzentrifugierung wurden die noch sauer reagierenden Abgüsse mit n/10 NaOH unter Prüfung durch Lackmuspapier neutralisiert und austitriert. Die Kontrolle bekam denselben Säurezusatz mit nachheriger Neutralisierung, um eine eventuell schädigende Wirkung der n/10 Salzsäure bei Ausdeutung der Versuchsergebnisse von vornherein in Abzug zu bringen. Während Ferrum hydrooxydatum dialysatum stets sehr leicht zu fällen war, setzten die übrigen therapeutischen, viel Schutzkolloid enthaltenden Präparate der Säurekoagulation häufig Widerstand entgegen, und zwangen teilweise behufs Herabminderung der Schutzkolloidwirkung zur Wahl höherer Serumverdünnungen. Nur diejenigen Experimente sind in Tabelle VII verwertet, bei denen die Fällung vollständig gelang und die Abgüsse wasserklar waren, da die bei unvollständiger Fällung zurückbleibende starke Trübung der Abgüsse eine sichere Beurteilung des Agglutinationsergebnisses unmöglich macht.

Aus Tabelle VII ist zu ersehen, daß bei langer Kontaktdauer mit 37° Ferrum dial. bei Cholera nur noch in der ersten, Kollargol in der ersten und zweiten Verdünnung eine schwache Agglutination aufweisen (Reduktion auf $^1/_{16}$ und $^1/_8$ Titer) und daß beide Hydrosole bei den übrigen Seren komplett adsorbierten. Bei kurzer Kontaktzeit und Zimmertemperatur blieb bei Ferrum dial. die Wirkung dieselbe, während Kollargol fast überall (bei Para B-Serum nur Erniedrigung auf die halbe Titerhöhe) versagte. Aus diesem Einfluß der Digerierungsdauer auf die Adsorptionsleistung bei letzterem erhellt schon, daß dieselbe nicht einfach Funktion der Niederschlagsbildung an sich sein kann. Bei der hinreichenden Kontaktdauer von nur 2—3 Minuten für Ferrum hydrooxyd. dial. sei auf die negative Wirkung der früheren massiven Niederschläge (Tabelle VI), insbesondere des $Al_2(OH)_6$ verwiesen, da dieses auch gallertige Beschaffenheit besitzt und dadurch dem $Fe_2(OH)_6$ aus Ferrum dial. qualitativ besonders nahe kommt. Eine wenn auch manchmal sehr kurze Kontaktzeit des Serums mit dem noch kolloidalem System erscheint für die Adsorption des Agglutinins (und des Eiweiß) notwendig; dieselbe erfolgt also

Tabelle VII.

Kontaktzeit 1 Stunde bei 37°

Typhusserum				Choleraserum				Paratyphus A-Serum				Paratyphus B-Serum			
Verd.	Kontr.	F. Dial.	Kol-largol	Verd.	Kontr.	F. Dial.	Kol-largol	Verd.	Kontr.	F. Dial.	Kol-largol	Verd.	Kontr.	F. Dial.	Kol-largol
1:200	+	—	—	1:160	±	±	±	1:200	.	.	.	1:160	+	.	.
1:400	++	—	—	1:320	±	—	±	1:400	+	—	—	1:320	+	—	—
1:800	++	—	—	1:640	++	—	—	1:800	+	—	—	1:640	+	—	—
1:1600	+	—	—	1:1280	++	—	—	1:1600	±	—	—	1:2800	+	—	—
1:3200	±	—	—	1:2560	++	—	—	1:3200	—	—	—	1:2560	+	—	—

Kontaktzeit 2—3 Minuten bei 15°

Typhusserum				Choleraserum				Para-A-Serum				Para-B-Serum			
Verd.	Kontr.	F. Dial.	Kol-largol	Verd.	Kontr.	F. Dial.	Kol-largol	Verd.	Kontr.	F. Dial.	Kol-largol	Verd.	Kontr.	F. Dial.	Kol-largol
1:100	+	—	+	1:100	++	—	++	1:200	±	—	±	1:100	.	.	.
1:200	+	—	+	1:200	++	—	++	1:400	±	—	±	1:200	++	—	++
1:400	+	—	+	1:400	++	—	+	1:800	±	—	+	1:400	++	—	++
1:800	+	—	+	1:800	++	—	++	1:1600	+	—	+	1:800	++	—	+
1:1600	+	—	+	1:1600	++	—	++	1:3200	+	—	+	1:1600	+	—	±
1:3200	+	—	+	1:3200	++	—	++	1:6400	+	—	+	1:3200	±	—	—
1:6400	±	—	±	1:6400	+	—	+	1:12800	—	—	—	1:6400	—	—	—

Paratyphus B-Serum							Paratyphus A-Serum						
Verd.	Kontr.	Elektro-kollargol		Elektro-ferrol		Kaseo-san	Verd.	Kontr.	Elektro-kollargol		Elektro-ferrol		Kaseo-san
		1^h–37°	2′–15°	1^h–37°	2′–15°				1^h–37°	2′–15°	1^h–37°	2′–15°	
1:200	++	±	++	±	++	.	1:200	++	.	.	.	.	. .
1:400	++	—	++	—	++	+	1:400	++	—	—	—	—	— —
1:800	++	—	++	—	+	+	1:800	++	—	—	—	—	— —
1:1600	++	—	++	—	+	+	1:1600	++	—	—	—	—	— —
1:3200	++	—	+	—	+	++	1:3200	++	—	—	—	—	— —
1:6400	++	—	±	—	+	++	1:6400	+	—	—	—	—	— —
1:12800	±	—	—	—	—	+	1:12800	—	—	—	—	—	— —

Typhusserum							Choleraserum						
Verd.	Kontr.	Elektro-kollargol		Elektro-ferrol		Kaseo-san	Verd.	Kontr.	Elektro-kollargol		Elektro-ferrol		Kaseo-san
		1^h–37°	2′–15°	1^h–37°	2′–15°				1^h–37°	2′–15°	1^h–37°	2′–15°	
1:600	+	—	—	—	—	+	1:600	++	±	±	±	+	++
1:1200	+	—	—	—	—	++	1:1200	++	—	—	—	—	++
1:2400	++	—	—	—	—	++	1:2400	++	—	—	—	—	++
1:4800	++	—	—	—	—	++	1:4800	++	—	—	—	—	++
1:9600	++	—	—	—	—	+	1:9600	++	—	—	—	—	++
1:19200	±	—	—	—	—	—	1:19200	±	—	—	—	—	—
1:38400	—	—	—	—	—	—	1:38400	—	—	—	—	—	—

im Solzustand und nicht erst beim Uebergang in die Gelphase.

Auch die Leistung der auf dem Wege der elektrischen Zerstäubung gewonnenen Präparate der Firma Heyden ist eine recht gute. Elektroferrol und Elektrokollargol adsorbierten bei Paratyphus B-Serum bei langer Digerierung fast komplett, bei kurzer zeigte sich nur eine Abschwächung in den höheren Verdünnungsstufen mit negativem Ausfall der letzten; bei den übrigen Seren wurde der Titer sowohl bei langer als auch kurzer Einwirkung auf Null oder $^1/_{32}$ seiner Höhe (Choleraserum) reduziert. Kaseosan adsorbierte bei Para A-Serum 2mal komplett, bei Typhus- und Choleraserum auf ungefähr den halben Titer; Para B-Serum blieb unbeeinflußt. Die metallischen Suspensionskolloide übertreffen somit das kolloidale Kasein bei weitem an Konstanz und Ausmaß der Adsorption, wobei ihre ungemein feine Suspension (der durchschnittliche Teilchendurchmesser des Elektrokollargols z. B. beträgt etwa 10 $\mu\mu$) gegenüber den gröberen Eiweißteilchen der Kaseosanlösung eine Rolle spielen mag.

Es gelingt also leicht, ein Immunserum mit obigen Hydrosolen seines Agglutiningehaltes zu berauben; es erhebt sich dabei die Frage nach etwaigen Veränderungen des Agglutinins bei diesem Prozeß und nach der Festigkeit bzw. Spaltbarkeit der neu entstandenen Kolloid-Agglutininverbindung.

Die Reversibilität von Agglutininen ist schon mehrfach Untersuchungsmaterie gewesen. So z. B. fanden Landsteiner und Reich (9, 10), daß Normalhämagglutinine aus den zusammengeballten Erythrozyten durch Wärmewirkung leicht, Immunhämagglutinine hingegen schwer zurückzugewinnen sind. Ballner und Sagasser (11) untersuchten bakterielle Agglutinate auf ihre Zerlegbarkeit und stellten dabei deren Irreversibilität fest, d. h. es konnten die an die Bakterien verankerten Immunagglutinine von denselben nicht mehr abgespalten werden. Hahn und Trommsdorff (12) hingegen berichteten darüber, daß in ihren Versuchen nach Lösung des Bakterienniederschlages durch Einwirkung von $^1/_{100}$ n. NaOH durch 1 Stunde bei 37 ^{0} die obenstehende Flüssigkeit ein geringes spezifisches Agglutinationsvermögen erhielt.

Bei meinem Versuch, aus den einzelnen Gelen das Agglutinin wieder herauszuholen und auf seine neuerliche Funktionsfähigkeit zu prüfen, ging ich folgendermaßen vor: durch Zusatz von 2 ccm $^{1}/_{100}$ n Natronlauge zu den abzentrifugierten Bodensätzen wurden die Gele von Elektrokollargol und Elektroferrol zunächst wieder kolloidisiert; die in den Heydenschen Lösungen enthaltenen Schutzkolloide verhinderten bei der Fällung die Zusammensinterung der ausgeschiedenen Metallteilchen zu größeren Partikelchen und befähigten sie so zur Peptisation, d. h. zur Rückverwandlung in den schon früher innegehabten kolloidalen Zustand [s. auch Kohlschütter (13), p. 280—284). Binnen weniger Minuten zerteilten sich die braunen Sedimente, durch Schütteln unterstützt, zu einer vollkommen klaren durchsichtigen Flüssigkeit von demselben Aussehen wie vor dem Gebrauch, die dann 1 Stunde bei 50° im Wasserbad gehalten wurde. Das Kaseosan-Gel ließ sich ebenso zum größten Teil wieder zerteilen und unterlag dann derselben Prozedur. Von der Vermutung ausgehend, daß Wärme und Lauge zusammen vielleicht eine Zerlegung der Kolloid-Agglutininverbindung bewerkstelligen könnten, teilte ich die wiedergewonnene Lösung nach erfolgter Digerierung in 2 Fraktionen. 1 ccm wurde ohne weitere Veränderung zur Herstellung einer zweiten Verdünnungsreihe (II) benutzt, die in der Tabelle VIII eine Stufe tiefer beginnt als die erste (I = Abguß nach der ersten Kolloidfällung), da sie nur die Hälfte der früheren Agglutininmenge enthält. Der zweite Teil obiger Lösung (1 ccm), der möglicherweise freies vom Kolloid abgespaltenes Agglutinin in sich barg, wurde einer abermaligen Elektrolytfällung durch n/10 Salzsäure unterworfen, und zwar in noch warmem Zustand, um eine sich etwa in der Kälte wieder vollziehende Adsorption zu vermeiden, der Kolloidniederschlag dann abzentrifugiert und mit dem klaren Abguß nach erfolgter Neutralisierung durch n/10 NaOH eine 3. Verdünnungsreihe (III) hergestellt. Parallel mit Fraktion II wurden Leerkontrollen (in Tabelle VIII nicht verzeichnet) in entsprechenden Verdünnungen angelegt, um zu sehen, inwieweit die Metallsole und die $^{1}/_{100}$ n NaOH etwa schon an und für sich auf die Bakterien agglutinierend wirken, wobei sich ein vollkommen negatives Resultat ergab.

Tabelle VIII.

Choleraserum								Typhusserum							
Verd.	Kontr.	Elektrokollargol			Elektroferrol			Verd.	Kontr.	Elektrokollarg.			Elektroferrol		
		I	II	III	I	II	III			I	II	III	I	II	III
1 : 400	++	—	—	—	—	.	—	1 : 300	++	.	.	.	.	.	.
1 : 800	++	—	—	—	—	++	—	1 : 600	++	±	.	.	—	.	.
1 : 1600	++	—	—	—	—	+	—	1 : 1200	++	—	+	—	—	+	—
1 : 3200	+	—	—	—	—	±	—	1 : 2400	++	—	++	—	—	++	—
1 : 6400	—	—	—	—	—	—	—	1 : 4800	++	—	++	—	—	++	—

Para B-Serum								Para A-Serum											
Verd.	Kontr.	Elektro-kollargol			Elektro-ferrol			Verd.	Kontr.	Elektro-kollargol			Elektro-ferrol			Kaseosan			
		I	II	III	I	II	III			I	II	III	I	I I	III	I	II	III
1 : 300	++	.	.	.	.	.	.	1 : 300	++	.	.	.	.	.	.	.	.	.
1 : 600	++	—	.	.	—	.	.	1 : 600	++	—	.	.	—	.	.	++	.	.
1 : 1200	++	—	±	—	—	+	—	1 : 1200	++	—	+	—	—	+	—	+	++	—
1 : 2400	++	—	+	—	—	+	—	1 : 2400	++	—	++	—	—	++	—	+	++	—
1 : 4800	++	—	—	—	—	±	—	1 : 4800	++	—	±	—	—	++	—	—	++	—

Para A-Serum										Para B-Serum[1]									
Verd.	Kontr.	Elektro-kollargol			Elektroferrol			Ferr.-Dial.		Verd.	Kontr.	Elektro-kollargol			Elektro-ferrol			F.-Dial.	
		I	II	III	I	II	III	I	II			I	II	III	I	II	III	I	II
1 : 200	++	.	.	.	.	.	.	.	.	1 : 200	++	.	.	.	.	.	.	.	.
1 : 400	++	—	.	.	—	.	.	—	.	1 : 400	++	++	.	.	++	.	.	—	.
1 : 800	++	—	++	—	—	++	—	—	—	1 : 800	++	++	—	—	++	—	—	—	—
1 : 1600	++	—	++	—	—	++	—	—	—	1 : 1600	++	+	—	—	++	—	—	—	—
1 : 3200	++	—	+	—	—	+	—	—	—	1 : 3200	+	—	—	—	+	—	—	—	—

Choleraserum										Typhusserum									
Verd.	Kontr.	Elektro-kollargol			Elektroferrol			Ferr.-Dial.		Verd.	Kontr.	Elektro-kollargol			Elektro-ferrol			F.-Dial.	
		I	II	III	I	II	III	I	II			I	II	III	I	II	III	I	II
1 : 200	++	—	.	.	.	.	.	.	.	1 : 200	±	.	.	.	.	.	.	.	.
1 : 400	++	—	.	.	—	.	.	—	.	1 : 400	±	—	.	.	—	.	.	—	.
1 : 800	++	—	—	—	—	++	++	—	—	1 : 800	+	—	+	—	—	±	—	—	—
1 : 1600	++	—	—	—	—	++	—	—	—	1 : 1600	+	—	±	—	—	+	—	—	—
1 : 3200	++	—	—	—	—	++	—	—	—	1 : 3200	+	—	—	—	—	+	—	—	—

1) Kolloidfällung gelang bei Fraktion I der Kollargol- und Ferrollösung nur unvollständig.

Das $Fe(OH)_3$-Gel aus Ferrum dialys. war im Gegensatz zu den therapeutischen Präparaten durch $^1/_{100}$ n. NaOH nicht peptisierbar (fehlendes oder zu geringes Schutzkolloid!); auf eine Anwendung der von Schierge (14) genannten Methode der Kolloidisierung von $Fe(OH)_3$ durch ein Natronlauge-Saccharosegemisch (8,0 Aqua dest., 2,0 ccm $^1/_{10}$ n. NaOH und 0,5 ccm Rohrzucker) habe ich verzichtet, da die so erhaltene Lösung in der Kälte sehr zersetzlich ist und bald neuerlich $Fe_2(OH)_6$ ausscheidet, und es mir nebstbei darauf ankam, eine Trennung des Agglutinins von dem gallertigen Gel ohne vorherige Rücküberführung in die Solphase zu versuchen. Der $Fe(OH)_3$-Bodensatz wurde demnach einfach mit 2 ccm $^1/_{100}$ n. NaOH unter oftmaligem Durchschütteln 1 Stunde bei 50^0 digeriert, dann wieder abzentrifugiert und mit dem Abguß eine Agglutinationsreihe angelegt (II).

Tabelle VIII gibt folgenden Einblick: Die Fraktionen II von Elektrokollargol und Elektroferrol zeigen fast überall deutliche Agglutination, d. h. die starke Avidität des Agglutinins zur homologen Bakterienart bewirkte ein Losreißen desselben von den Metallteilchen und damit einen Zerfall der Kolloid-Agglutininverbindung. Bei Choleraserum war nur die Ferrol-, nicht aber die Kollargolverbindung spaltbar. Die Kaseosanfraktion I und II bei Para A zeigt ebenfalls deutliche Agglutination, und zwar sieht man bei I den Titer auf die Hälfte reduziert (unvollständige Adsorption) und bei II wieder in alter Höhe, d. h. die vom Kaseosan aufgenommene Agglutininportion, deren Fehlen bei I die Titersenkung verursachte, erscheint nunmehr in II wiedergewonnen und zeigt jetzt die der Kontrolle entsprechende Agglutinationshöhe. Der in Tab. VIII aufgenommene zweite Para B-Versuch lehrt, daß bei erstmaliger inkompletter Fällung (I) kein oder zu wenig Agglutinin entfernt wurde, um in II wiedergewonnen werden zu können.

Fraktion III zeigt mit Ausnahme des einen Choleraserums überall negatives Ergebnis; Wärme und Lauge scheinen in der Regel nicht imstande zu sein, die Kolloid-Agglutininverbindung derart zu spalten, daß das Agglutinin in dem nach zweitmaliger Zentrifugierung restierenden Abguß (III) zurückbliebe. Einmal von den kolloiden Teilchen adsorbiert, scheint

das Agglutinin fest daran gebunden und mit deren weiterem Schicksal verknüpft zu sein, und nur gegenüber der starken Anziehungskraft der homologen Bakterien sich aus der neuen Verbindung losreißen zu können. Darauf weist besonders das Verhalten des $Fe(OH)_3$-Gels aus Ferrum dial. hin. Es gelingt nicht, aus der gallertigen Masse desselben das Agglutinin abzutrennen, denn dafür ist die adsorptive Verkittung zwischen beiden viel zu fest. Vorbedingung für die Funktion der Fraktion II bei Elektrokollargol, Elektroferrol und Kaseosan war ja eben die neuerliche Zerteilung des Agglutinins zusammen mit den Metall-(Eiweiß-)Teilchen in den ursprünglichen Lösungszustand, um ihm eine Kontaktmöglichkeit mit den Bakterien zu geben. Dabei vermochte die Einwirkung von Wärme und Lauge die Innigkeit der adsorptiven Anlagerung nicht genügend zu lockern (III), sondern nur die Kraft der zwischen Agglutinin und adäquatem Bakterium bestehenden spezifischen Affinität führte die Sprengung derselben herbei.

Wenn ich zu Beginn dieses Abschnittes einleitend bemerkte, daß die Immunsera Suspensionen und Hydrosolen gegenüber ihren sonstigen Elektivismus scheinbar eingebüßt hätten, so sei jetzt betont, daß bei diesem Verhalten gar kein Widerspruch mit ihrer Spezifität vorzuliegen braucht, weil die Agglutininadsorption durch homologe Bakterien (als erste der eigentlichen Ausflockung vorangehende Phase) und durch Kolloide (oder Suspensionen) wahrscheinlich doch wesentlich voneinander verschiedene Prozesse sind. Während es sich bei letzteren nur um ein rein pyhsikalisches Phänomen handeln dürfte, können wir bei der spezifischen Bindung durch Bakterien (der die nur sekundäre Ausflockung selbst ja keineswegs zu folgen braucht, z. B. bei Suspension unter ganz salzfreien Kautelen) nicht umhin, an chemische Affinitäten im Sinne der Ehrlichschen Seitenkettentheorie zu denken. So sehr der Ausflockungsvorgang selber im Sinne der allgemein kolloidalen Fällungsprozesse interpretierbar ist, so wenig kann man bei der für die spätere Zusammenballung erforderlichen primären Bindung zwischen Bakterienleib und Agglutinin behufs Verständnis ihrer Spezifität die Annahme chemischer Reaktionskräfte entbehren.

Am Schlusse sei noch einer Seite vorliegender Untersuchung gedacht, nämlich der Eiweißadsorption. Es ist ja von vornherein selbstverständlich, daß es sich dabei nicht um eine reine Immunkörperadsorption handeln kann, sondern daß das Schicksal der Agglutinine bis zu einem gewissen Grad mit dem der Serumeiweißkörper verknüpft ist. Die Enteiweißung von Seren durch Ferrum hydrooxyd. dial. und Kaolin z. B. ist ja eine längst bekannte Sache. Der in Tabelle IX mitgeteilte Versuch soll einen orientierenden Ueberblick über den Parallelismus zwischen Agglutinin- und

Tabelle IX.

Serumart	Reaktion der Abgüsse auf Sulfosalizylsäure										
	Kontrolle	Elektrokollargol	Elektroferrol	Ferrum-dialys. I	Ferrum-dialys. II	$BaSO_4$	Kaolin	Bolus alba	Tierkohle	Kasein (Hamm.)	Leerkont. v. Kasein
Cholera (2)	+++	—	—	—	—	+	+	+	—	+++	+++
Para A (1)	+++	—	—	—	—	++	+	.	—	+++	+++
Dys. Kruse (2)	+++	.	.	.	.	+	.	+	±	.	.
Typhus (2)	++	—	—	—	—	±	+	—	—	.	.
Para B (2)	++	—	—	—	—	+	+	±	—	.	.

Eiweißaufnahme vermitteln. Die Abgüsse wurden auf dieselbe Weise und in derselben Verdünnung hergestellt, wie bei den früheren Experimenten, ihr Eiweißgehalt durch Zusatz von 3 Tropfen einer 20-proz. Sulfosalizylsäure geprüft und nach der Dichte der dabei entstehenden Trübung in Form folgender Skala approximativ abgestuft. Zeichen +++ = undurchsichtige Trübung mit grober Ausflockung, ++ = noch starke Trübung, eine Spur durchsichtig mit feinen Flocken, + = schwache Trübung, langsam Flocken ausscheidend, ± = eben noch wahrnehmbare Opaleszenz auf schwarzem Hintergrund. Eine prozentuale Ermittlung des Eiweißgehaltes mit Hilfe des Eintauchrefraktometers war wegen der beträchtlichen Höhe der Serumverdünnungen leider nicht möglich, eine Anwendung konzentrierten Serums oder niedriger Verdünnungen erschien ausgeschlossen, da bekanntermaßen die Eiweißadsorption bei geringeren Verdünnungen kleinere Werte liefert als bei hohen und der Vergleich mit der Agglutininadsorption dieselben Versuchsbedingungen voraussetzt.

Die vergleichende Betrachtung der Tabelle IX mit den Tabellen V und VII zeigt, daß bei den Adsorbentien, die früher sämtliches Agglutinin an sich gerissen hatten, die Abgüsse auch keine Eiweißreaktion mehr geben, ferner, daß die Fraktion II von Ferrum dialys., die von dessen Gel das Agglutinin hätte abspalten sollen, auch keine Eiweißkörper zurückgewinnen konnte. Bis dahin herrscht völlige Uebereinstimmung. Bei näherer Betrachtung der übrigen Adsorbentien ergeben sich jedoch einige Differenzen, die das Agglutinin nicht restlos im Schlepptau der Serumproteine erscheinen lassen. So erniedrigen $BaSO_4$ und Kaolin den Eiweißgehalt des Choleraserums ganz erheblich, ohne früher den Titer irgendwie beeinflußt zu haben. Bei Para A-Serum ist der Eiweißverlust durch Kaolin stark, der Agglutininentzug null. Bei Typhusserum bewirkt $BaSO_4$ fast kompletten, Kohle gänzlichen Eiweißschwund, aber keine Titererniedrigung (nur leichte Abschwächung der Agglutination von der 2. bzw. 4. Verdünnungsstufe ab), Bolus vollständige Enteiweißung ohne die Agglutination nennenswert zu beeinflussen. Bei Para B entziehen $BaSO_4$ und Kaolin deutlich Eiweiß, ohne die Titerhöhe zu ändern. Die Eiweiß- und Agglutininadsorption bei Dysenterie Shiga-Kruse bieten annähernd kongruente Bilder. Die Reaktion des Kaseinabgusses ist nicht auswertbar, da die Leerkontrolle ebenfalls starke Eiweißreaktion zeigt, d. h. das Kasein geht bei der Digerierung in der Wärme teilweise in Lösung.

Ich bin mir der quantitativen Ungenauigkeit dieser vergleichenden Schätzung vollkommen bewußt und wollte damit nur orientierend zeigen, daß die Eiweißadsorption unter Umständen recht beträchtlich sein kann, ohne den Agglutiningehalt entsprechend zu reduzieren. Es resultieren daraus zwei Erklärungsmöglichkeiten: entweder ist in den Fällen, wo starke Eiweißaufnahme mit unverändertem oder nur wenig vermindertem Agglutinationstiter einhergeht, so viel Agglutinin im Ueberschuß vorhanden, daß trotz reichlicher Adsorption noch genug übrig bleibt, um den Titer aufrecht zu erhalten. Oder die spezifischen Immunagglutinine setzen ihrer Adsorption größeren Widerstand entgegen als die unspezifischen Eiweißkörper des Serums und stellen an die Leistungsfähigkeit des Adsorbens größere Anforderungen. Sehr starken Attraktions-

kräften, wie sie z. B. von den Metallhydrosolen und der Tierkohle ausgehen, erliegen sie ebenso wie das Serumeiweiß, weniger bindungsfähigen Adsorbentien gegenüber vermögen sie sich bis zu einem gewissen Grad refraktär zu verhalten, was auf nicht näher präzisierbare physikalische Verschiedenheiten von den Proteinen hindeuten würde.

Zusammenfassung.

1) Bakterielle Immunagglutinine sind durch grobe Suspensionen inkomplett und inkonstant adsorbierbar, wobei die Tierkohle weitaus die besten Wirkungen entfaltet. Von den Seren sind solche von niedrigem Titer der Adsorption besser zugänglich als solche von hohem Titer.

2) Agglutinine gleicher Spezifität, aber verschiedenen Seren entstammend, geben inkongruente Adsorptionsbilder, was vielleicht auf mit der Tierindividualität zusammenhängende oder sonstige nicht näher faßbare Unterschiede in der Serumbeschaffenheit schließen läßt.

3) Plötzlich entstehende Niederschläge massiver (Fe_2O_3—$AgCl$) und gallertiger Natur [$Al_2(OH)_6$], welche rasch sedimentieren, vermögen den Agglutiningehalt eines Serums gar nicht oder nur in minimalem Ausmaß zu reduzieren, während Niederschläge, die einige Zeit in sehr feiner Dispersion verharren und nur langsam zu größeren Teilchen zusammensintern ($BaSO_4$), Agglutinin zu binden imstande sind.

4) Durch Digerierung mit Metallhydrosolen können die Immunsera ihres Agglutiningehaltes gänzlich beraubt werden, wobei sich ein begünstigender Einfluß längerer Kontaktzeit und höherer Temperatur (37^0) in den meisten Fällen nicht erkennen läßt. Ebenso spielt der elektrische Ladungssinn der Kolloide dabei keine nachweisliche Rolle. Viel geringer und inkonstanter ist die Wirkung kolloidaler Eiweißlösungen (Kaseosan).

5) Einmal an das Kolloid gebunden, vermögen weder Eiweißkörper noch Agglutinin aus dessen Gelzustand abgespalten zu werden.

6) Bei neuerlicher Kolloidisierung der das Agglutinin in sich bergenden Metallgele (oder Eiweiß-) und Kontakt mit der homologen Bakterienaufschwemmung wird durch dieselbe

das Agglutinin von den Metall(Eiweiß)teilchen losgerissen und an sich verankert, was zur Ausflockung der Bakterien führt. Hingegen bewirken Wärme und $^{1}/_{100}$ n. NaOH keine Spaltung der Agglutinin-Kolloidverbindung.

7) Metallhydrosole und die Tierkohle adsorbieren aus einem Immunserum das Eiweiß ebenso wie seine Agglutinine. Bei nicht ganz vollständiger Enteiweißung durch grobe Suspensionen (Kaolin, $BaSO_4$) bleibt der Agglutininverlust (an der Titerhöhe gemessen) gegenüber dem Eiweißentzug oft beträchtlich zurück.

Literaturverzeichnis.

1) Landsteiner, Centralbl. f. Bakt., Bd. 41.
2) Andrejew, Arb. a. d. Kaiserl. Ges.-Amt Berlin, Bd. 33.
3) Friedberger-Salecker, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 11, p. 574.
4) Wolff, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 11, p. 154.
5) L. Michaelis, Berl. klin. Wochenschr., 1918, No. 30.
6) Gutfeld, Centralbl. f. Bakt., 1919, S. 102.
7) Bechhold, Zeitschr. f. Kolloidchemie, Bd. 23, 1918.
8) Eisler, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 6, 1910, p. 620.
9) Landsteiner und Reich, Centralbl. f. Bakt., Bd. 39, 1905.
10) — — Zeitschr. f. Hyg., Bd. 58, 1908.
11) Ballner und Sagasser, Arch. f. Hyg., Bd. 51, 1904.
12) Hahn und Trommsdorff, Münch. med. Wochenschr., 1900, p. 431.
13) Kohlschütter, Vorlesungen über Kolloidchemie, 1917, Teubner-Verlag.
14) Manfred Schierge, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 29, 1920.

[Aus der wissenschaftlichen Abteilung des Instituts für experim. Krebsforschung zu Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. H. Sachs).]

Ueber die Bedeutung des Salzgehaltes für die Reaktionsfähigkeit aktiver Sera bei den Ausflockungsmethoden zum serologischen Luesnachweis.

Von Dr. **F. Georgi** und Dr. **H. Lebenstein.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 29. September 1921.)

Die schon von H. Sachs und W. Georgi[1]) beobachtete Tatsache, daß bei der Ausflockungsreaktion mit cholesteri-

1) H. Sachs und W. Georgi, Med. Klinik, 1918, No. 33.

nierten Extrakten die aktiven Sera im Gegensatz zu den inaktivierten meist negativ reagieren oder unspezifische Befunde ergeben, haben durch neuere Untersuchungen eine befriedigende Aufklärung gefunden. Schon W. Georgi[1]) hatte darauf hingewiesen, daß für die mangelnde Reaktionsfähigkeit des aktiven Serums wohl eine einer Schutzkolloidwirkung vergleichbare Hemmungsfunktion verantwortlich zu machen ist, die unmittelbar von der Labilität des Serums abhängt und durch das Inaktivieren stabilisiert wird. In Uebereinstimmung damit hatten Untersuchungen von Neukirch[2]), sowie von Mandelbaum[3]) ergeben, daß mit der Entfernung der labilsten Eiweißkomponenten aus dem Serum durch Vorbehandlung mit geglühtem Kieselgur oder durch Kohlensäurefällung aktive Sera auch ohne Inaktivierung durch thermischen Eingriff eine mehr oder weniger charakteristische Reaktionsfähigkeit bei der Ausflockung erlangen. Untersuchungen von Sachs[4]) haben weiterhin gezeigt, daß man auch, ohne Bestandteile des Serums zu entfernen, die Reagierbarkeit dadurch hervorrufen kann, daß man das aktive Serum mit Salzsäure oder in gewissem Grade auch mit Natronlauge vorbehandelt. Die labilen, die typische Reaktion verhindernden Bestandteile des aktiven Serums sind also säureempfindlich und werden durch die Salzsäureeinwirkung derart verändert, daß sie beim serologischen Luesnachweis nicht mehr störend interferieren.

Sprachen diese Erfahrungen für eine Hemmungswirkung durch eine zu große Labilität der Serumeiweißstoffe, die wohl im Sinne einer Schutzkolloidwirkung aufzufassen ist, so war die Möglichkeit gegeben, durch Verwendung eines auf die Labilität des Serums hemmend wirkenden Mediums zu dem gleichen Ergebnis zu gelangen. Tatsächlich ist es durch Erhöhung der Kochsalzkonzentration (von 0,85 Proz. auf 1,5 Proz.) gelungen, auch mit aktiven Seris die gleichen Ergebnisse bei der Ausflockung

1) W. Georgi, Biochem. Zeitschr., Bd. 93, 1919, p. 16.

2) P. Neukirch, Med. Klinik, 1921, No. 3; Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 29, 1920, p. 498.

3) M. Mandelbaum, Münch. med. Wochenschr., 1920, No. 33.

4) H. Sachs, Arch. f. Derm., Bd. 135, 1921, p. 338.

zu erhalten, wie sie früher nur mit inaktivierten Seris erzielbar waren[1].

Schon aus den älteren Versuchen W. Georgis[2] hatte sich ergeben, daß die Empfindlichkeit der Ausflockungsreaktion auch bei Verwendung inaktivierter Sera durch eine Erhöhung der Salzkonzentration innerhalb gewisser Grenzen gesteigert werden kann. Jedoch hat im Gegensatz zu diesen nur quantitativen Unterschieden der Einfluß der Salzkonzentration bei aktivem Serum einen durchaus qualitativen Charakter. Man wird freilich nicht fehlgehen in der Annahme, daß gelegentlich auch nach der Inaktivierung im Serum die labileren Komponenten einen gewissen hemmenden Einfluß auf die Ausflockung ausüben können und dieser durch den erhöhten Kochsalzgehalt mehr oder weniger ausgeschaltet wird.

Hatten nun diese Ergebnisse den Gegensatz, der im Verhalten des aktiven Serums bei der Wassermannschen Reaktion und bei der Sachs-Georgi-Reaktion besteht, in befriedigender Weise aufgeklärt, so lag es weiterhin nahe, auch das bis zu einem gewissen Grade gegensätzliche Verhalten der aktiven Sera bei der Sachs-Georgi-Reaktion und bei der sogenannten Dritten Modifikation von Meinicke als Folge einer Funktion des Kochsalzgehaltes aufzufassen. Ein grundsätzlicher Unterschied zwischen den beiden genannten Ausflockungsreaktionen dürfte ja kaum zu erblicken sein. Beide folgen dem von Sachs und Georgi erfolgreich in die Praxis eingeführten Prinzip der einzeitigen Ausflockung. Das hinreichend für die Ausflockung erforderliche verstärkende Moment ist bei den Sachs-Georgi-Extrakten in der Cholesterinierung, bei den Extrakten Meinickes in der besonderen Herstellung der Extrakte (Aetherrestextrakte aus Pferdeherzen) zu erblicken. Wenn trotzdem bei der Dritten Modifikation im Gegensatz zur Sachs-Georgi-Reaktion auch aktive Sera ebenso, oder nach den Angaben von Epstein und Paul[3]) sogar stärker reagieren, als die inaktivierten Sera, so erschien es möglich, die Ursache dieser Differenzen lediglich in dem verschiedenen

1) H. Sachs und F. Georgi, Med. Klinik, 1921, No. 33.

2) W. Georgi, a. a. O.

3) E. Epstein und F. Paul, Arch. f. Hyg., Bd. 90, 1921, p. 98.

Kochsalzgehalt zu suchen. Schon Sachs[1]) hat darauf hingewiesen, daß bei der üblichen Ausführung der Meinickeschen Dritten Modifikation mit inaktivierten Seris es kaum von Bedeutung ist, ob man die übliche physiologische (0,85-proz.) Kochsalzlösung oder die von Meinicke vorgeschriebene 2-proz. Kochsalzlösung als Medium benutzt. Hingegen durfte man erwarten, daß nach den von H. Sachs und F. Georgi[2]) erhobenen Befunden die Verwendung der 2-proz. Kochsalzlösung zur Meinickeschen Dritten Modifikation beim Arbeiten mit aktivem Serum von ausschlaggebender Bedeutung ist.

Wir haben daher vergleichende Untersuchungen mit der Meinickeschen Dritten Modifikation unter Verwendung aktiven Serums vorgenommen, indem wir einerseits 0,85-proz., andererseits 2-proz. Kochsalzlösung als Verdünnungsmedium benutzten. Daneben wurden Parallelversuche mit inaktivierten Seris ausgeführt, und zwar sowohl in der Anordnung der Sachs-Georgi-Reaktion als auch in der von Meinickes Dritter Modifikation.

Zur Ausführung der Dritten Modifikation von Meinicke dienten die aus der Adlerapotheke in Hagen bezogenen Meinicke-Extrakte No. XII und XIII. Die Versuchsanordnung entsprach durchaus den Vorschriften Meinickes. Es wurden 0,2 ccm Serum mit 0,8 ccm der nach Vorschrift Meinickes $8^1/_2$-fach verdünnten Extrakte gemischt. Die Extraktverdünnung geschah derart, daß zunächst 1 Teil Extrakt mit $^1/_2$ Teil Aqua destillata gemischt wurden und nach $^3/_4$—1-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur weiterer rascher Zusatz von 7 Teilen 2-proz. bzw. 0,85-proz. Kochsalzlösung erfolgte.

Zur Ausführung der Sachs-Georgi-Reaktion dienten cholesterinierte Rinderherzextrakte, die in üblicher Weise 6-fach zweizeitig mit Kochsalzlösung verdünnt wurden. 0,5 bzw. 0,25 ccm der Extraktverdünnungen wurden mit je 1,0 bzw. 0,5 ccm der 5-fach verdünnten Patientensera gemischt.

Die Versuchsröhrchen (mit Einschluß der erforderlichen Kontrollen) blieben über Nacht im Brutschrank und wurden sodann im Kuhn-Woitheschen Agglutinoskop abgelesen. Das Ergebnis wurde mit +++, ++, +, ±, —, je nach der Stärke der erfolgten Ausflockung, notiert.

Durchaus der Erwartung entsprechend, ergab sich nun die wesentliche Bedeutung des Kochsalzgehaltes beim Arbeiten

1) H. Sachs, Arch. f. Derm., Bd. 132, 1921, p. 17.

2) H. Sachs und F. Georgi, a. a. O.

mit aktiven Seris. Der folgende Auszug aus unseren Versuchen zeigt die vorliegenden Bedingungen.

Es wurde gleichzeitig ausgeführt:

I. Sachs-Georgi-Reaktion mit inaktiviertem Serum und 0,85-proz. Kochsalzlösung.

II. Sachs-Georgi-Reaktion mit aktivem Serum und 1,5-proz. Kochsalzlösung.

III. Meinickes Dritte Modifikation mit inaktiviertem Serum und 0,85-proz. Kochsalzlösung.

IV. Meinickes Dritte Modifikation mit inaktiviertem Serum und 2-proz. Kochsalzlösung.

V. Meinickes Dritte Modifikation mit aktivem Serum und 0,85-proz. Kochsalzlösung.

VI. Meinickes Dritte Modifikation mit aktivem Serum und 2-proz. Kochsalzlösung.

Das Ergebnis zeigt die folgende Tabelle I (siehe p. 508).

Die Tabelle bestätigt zunächst die früheren Erfahrungen: sie zeigt nämlich, daß bei Meinickes Dritter Modifikation die inaktivierten Sera in 0,85-proz. Kochsalzlösung fast ebenso reagieren wie in 2-proz. Kochsalzlösung, und daß die Sachs-Georgi-Reaktion mit aktivem Serum unter Verwendung von 1,5-proz. Kochsalzlösung als Medium typisch ausfällt. Die Spalten V und VI der Tabelle zeigen aber zugleich, daß die Tatsachen unseren Erwartungen entsprechen: Während bei Verwendung inaktivierter Sera die Unterschiede des Kochsalzgehaltes in Meinickes Dritter Modifikation fast einflußlos sind, zeigt sich bei Verwendung aktiver Sera die ausschlaggebende Bedeutung der Kochsalzkonzentration. In 0,85-proz. Kochsalzlösung reagieren bei der Dritten Modifikation fast alle aktiven Sera negativ, während sie fast durchweg in 2-proz. Kochsalzlösung ebenso reagieren wie im inaktivierten Zustande. Daß manche aktive Sera auch in 0,85-proz. Kochsalzlösung bereits typische Reaktionen ergeben, kann nicht überraschen, da eben die Labilität des aktiven Serums nicht immer hinreichend stark zu sein braucht, um die Reaktionsfähigkeit zu hemmen. Das ist um so verständlicher, als die aktiven Sera

Tabelle I.

Ergebnis der WaR.	Ausflockung bei der Sachs-Georgi-Reaktion		Ausflockung bei der Dritten Modifikation Meinickes mit			
	I. inakt. Ser. 0,85-proz. NaCl	II. akt. Ser. 1,5-proz. NaCl	III. inakt. Ser. 0,85-proz. NaCl	IV. inakt. Ser. 2-proz. NaCl	V. akt. Ser. 0,85-proz. NaCl	VI. akt. Ser. 2-proz. NaCl
positiv	+++	+++	+++	+++	±	+++
„	+++	+++	+++	+++	—	+++
„	+++	++	+++	+++	—	+++
„	+++	+++	+++	+++	—	+++
„	±	+	—	++	—	—
„	+++	+++	+++	+++	—	+++
„	+++	+++	+++	+++	±	+++
„	+++	+++	+++	+++	—	+++
„	+++	+++	+++	+++	—	+++
„	+++	+++	+++	+++	—	+++
„	+++	+++	+++	+++	+++	+++
„	+++	+++	+++	+++	—	+++
„	+++	+++	+++	+++	—	+++
„	++	+	++	++	—	+++
„	+++	+++	+++	+++	—	+++
„	++	+++	+	++	±	+++
„	+++	++	+++	++	—	+++
„	+++	+++	+++	+++	+++	+++
„	+++	+++	+++	+++	—	+++
„	+++	+++	+++	+++	—	+++
„	+++	+++	+++	+++	—	+++
„	++	+	+++	+++	+++	+++
„	++	+	++	++	—	++
„	++	+	—	—	—	—
„	±	+	—	—	—	—
„	—	—	—	—	—	—
fraglich	±	—	—	—	—	—
„	+	+	—	—	—	—
„	+	++	—	±	—	—
„	++	+	—	—	—	—
„	+++	+++	+++	++	—	+++
„	+	++	+	+	—	+

nicht immer unmittelbar nach ihrer Gewinnung zur Untersuchung gelangen konnten und während des Zeitintervalls zwischen Gewinnung und Prüfung Gelegenheit zu mehr oder weniger starker Stabilisierung gegeben ist. Der Einfluß, der der Aufbewahrungszeit der Sera zweifellos zukommt, zeigte sich bei manchen Serumproben, bei denen Gelegenheit zu mehrmaliger Untersuchung an verschiedenen Tagen gegeben war. Ein Versuchsbeispiel dieser Art bietet die Tabelle II.

Tabelle II.

Untersuchung am	Ausflockung bei Meinickes Dritter Modifikation in	
	a) 0,85-proz. NaCl	b) 2-proz. NaCl
1. Tag	—	+++
2. Tag	+++	+++

Die für die Reaktionsfähigkeit bei schwachem Salzgehalt erforderliche Stabilisierung kann also bereits durch einfaches Lagern der Serumproben erreicht werden.

Insgesamt haben wir in Parallelversuchen mit verschiedenem Salzgehalt 153 Sera geprüft, und das Ergebnis spricht durchaus im Sinne der formulierten Gesetzmäßigkeit; zum Beleg dafür mag es genügen, in der folgenden Tabelle III die 36 Wassermann-positiven Sera anzuführen.

Tabelle III.

Anzahl	Es reagierten bei				
	Sachs-Georgi-Reaktion	Meinickes III. Modifikation			
		inaktives Serum		aktives Serum	
		0,85-proz. NaCl	2-proz. NaCl	0,85-proz. NaCl	2-proz. NaCl
5	+	+	+	+	+
2	+	+	+	?	+
1	+	—	+	—	—
2	+	—	—	—	—
1	—	—	—	—	—
25	+	+	+	—	+
36					

Auf die übrigen teils verdächtigen, teils negativen Sera einzugehen, erübrigt sich, da es uns hier nur darauf ankam, zu zeigen, daß auch bei der Dritten Modifikation Meinickes, ebenso wie bei der Sachs-Georgi-Reaktion, ein erhöhter Kochsalzgehalt für die Reaktionsfähigkeit der aktiven Sera eine conditio sine qua non ist, während er für die Prüfung des inaktivierten Serums ohne wesentliche Bedeutung erscheint. Es bestätigt sich daher auch

durch diese Erfahrungen die Wesensgleichheit der beiden Verfahren des serologischen Luesnachweises.

Zusammenfassung.

1) In Uebereinstimmung mit früheren Erfahrungen reagierten inaktive Sera unter Benutzung der Meinickeschen Aetherrestextrakte (Meinickes Dritte Modifikation) in 0,85-proz. und 2-proz. Kochsalzlösung gleich stark.

2) Dagegen reagierten aktive Sera unter gleichen Bedingungen in ausgesprochener Abhängigkeit vom Salzgehalt des Mediums. Während sie in 0,85-proz. Kochsalzlösung nur selten positive Reaktion aufwiesen, verhielten sie sich in 2-proz. Kochsalzlösung etwa in Uebereinstimmung mit den inaktiven Seris.

3) In den aktiven Seris kommen also bei Meinickes Dritter Modifikation ebenso wie bei der Sachs-Georgi-Reaktion Hemmungsstoffe zur Geltung, die durch erhöhten Salzgehalt ebenso wie durch Inaktivieren oder auch durch Lagern der Sera ausgeschaltet werden.

4) Die erhobenen Befunde zeigen daher erneut, daß die als Dritte Modifikation bezeichnete Anordnung der Ausflockung in ihrem Wesen durchaus der Sachs-Georgi-Reaktion entspricht. Beide Flockungsmethoden folgen dem Prinzip der einzeitigen Methodik; der Unterschied besteht nur in der Benutzung verschiedenartiger Extrakte.

[Aus dem Hygiene-Institut der Universität Greifswald
(Direktor: Prof. Dr. E. Friedberger).]

Untersuchungen über den Rezeptorenapparat in der Paratyphusgruppe [1]).

Von Privatdozent Dr. **F. Schiff**,
I. Assistent am Institut.

Mit 1 Abbildung im Text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 12. Oktober 1921.)

In den Jahren 1899 bis 1901 fand Schottmüller [2]) von den Typhusbazillen unterschiedene Keime bei Krankheitsfällen, die dem Typhus abdominalis völlig glichen oder zum mindesten sehr ähnlich sahen. Bei dem ersten dieser Fälle, den er im Jahre 1900 mitgeteilt hat, „entsprach der klinische Verlauf des Falles, abgesehen vielleicht von einem Initialsymptom, so vollkommen dem Bilde des Typhus, daß man wohl berechtigt ist, vom klinischen Standpunkt aus den Krankheitsfall zunächst als Typhus anzusehen".

Auch die im Jahre 1901 von Kurth beschriebenen Krankheitsfälle ähnelten klinisch dem Bilde des Typhus abdominalis.

Ebenso hatte es sich bei den 1896 von Achard und Bensaude veröffentlichten „infections paratyphoidiques" und bei den von Gwynn beobachteten Fällen um Erkrankungen

1) Vorgetragen in der Berl. mikrobiolog. Gesellschaft, Sitzung vom 12. Dez. 1921.

2) Für die ältere Literatur sei auf die einschlägigen Artikel von Neufeld in Kolle-Wassermann, 1. Aufl.; Uhlenhuth und Hübener, ebenda, 2. Aufl., und auf das Uebersichtsreferat von Sobernheim, Hyg. Rundschau, Bd. 22, 1912, verwiesen.

gehandelt, die damals klinisch als Typhus abdominalis angesehen worden waren.

Es stellte sich bald heraus, daß die Hauptgruppe der gefundenen neuartigen Krankheitskeime, nämlich die seither als Paratyphus B-Bazillen bezeichneten, nach ihrem bakteriologischen und serologischen Verhalten mit einem Teil der schon früher bei Enteritis gefundenen Bakterien übereinstimmten.

Auch diese Stämme, als deren typischer Vertreter das Bacterium enteritidis Breslau von Kaensche-Flügge[1]) gelten kann, gewöhnte man sich als Paratyphus B-Bazillen zu bezeichnen, und Schottmüller[2]) gelangte dazu, entsprechend dieser vermeintlichen bakteriologischen Einheit, für eine Reihe klinisch recht verschiedenartiger Krankheitszustände den ätiologisch einheitlichen Begriff der Paratyphusinfektion aufzustellen, wobei er mehrere Hauptformen unterscheidet, darunter als die wichtigsten: „die Gastroenteritis paratyphosa oder die gastrointestinale Form der Fleisch- oder Nahrungsmittelvergiftung" und den „Paratyphus abdominalis B, die typhöse Form der Fleisch- oder Nahrungsmittelvergiftung" [3]).

Der Name Paratyphus hat damit seine ursprüngliche Bedeutung zum Teil eingebüßt; denn mit ihm sollten anfänglich Keime bezeichnet werden, die wohl das Krankheitsbild des Typhus hervorrufen, aber von den Typhusbazillen verschieden sind.

Das Bestreben nach Anpassung an die bakteriologische Anschauung hat also Schottmüller dazu geführt, von vornherein grundsätzlich alle Paratyphus B-Infektionen, auch die

1) Kaensche, Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg., 1894; Zeitschr. f. Hyg., Bd. 22, 1896.

2) Schottmüller in Mohr-Stähelin, Handb. d. inneren Med., 1911.

3) Im Folgenden werden in Uebereinstimmung mit R. Müller und Bitter die „Fleischvergifter der Paratyphusgruppe" im Gegensatz zum Bac. enteritidis Gärtner als Bac. enteritidis Breslau bezeichnet. Berechtigt wäre auch die Benennung dieser Gruppe nach den von van Ermenghem und de Nobele gefundenen „Aertryckstämmen", da diese Autoren zum ersten Mal die Erreger menschlicher Fleischvergiftungen auf Grund des serologischen Verhaltens in die heute noch anerkannten beiden Hauptgruppen eingeteilt haben, indem sie dem Typus Gärtner den Typus Aertryck gegenüber stellten.

mit typhösem Verlauf, als Fleisch- oder Nahrungsmittelvergiftungen anzusehen.

Für die Frage, wie ein so differentes Krankheitsbild „wie die Gastroenteritis einerseits und der Paratyphus abdominalis durch dieselben Bazillen erzeugt werden“ können, sind von Schottmüller und von Trautmann besondere Hypothesen aufgestellt worden, auf die hier nicht weiter eingegangen werden kann.

Nach der Anschauung von Friedberger werden die verschiedenen Symptome bei Infektionskrankheiten durch ein im Körper aus den Krankheitserregern abgespaltenes einheitliches Gift, das Anaphylatoxin, hervorgerufen. Hierdurch wird es unserem Verständnis näher gebracht, daß ein und derselbe Bazillus je nach seiner Lokalisation und seinem sonstigen biologischen Verhalten verschiedene Krankheitsbilder erzeugt. Aber auch das Umgekehrte ist möglich, daß verschiedene Krankheitserreger, wie es in der Tat der Fall ist, nämlich Typhusbazillen und Paratyphusbazillen auf der einen Seite, Gärtnerbazillen und Vertreter der Paratyphusgruppe auf der anderen Seite jeweils identische Krankheitsbilder erzeugen.

Nach den seitherigen Erfahrungen ist es nun aber nicht mehr angängig, die typhöse Form des Paratyphus als Nahrungsmittelvergiftung anzusehen. Als Regel kann heute vielmehr gelten, daß die Uebertragung ebenso wie beim echten Typhus abdominalis, also in der Hauptsache von Mensch zu Mensch, erfolgt.

Die Gleichstellung der Fleischvergifter und der alten Schottmüllerschen Paratyphusbazillen auf Grund des bakteriologischen, insbesondere auch des serologischen Verhaltens forderte den Widerstand einzelner Kliniker heraus. Insbesondere Jürgens hat dagegen Einspruch erhoben, daß nun auch die klinische Diagnose sich der vom Bakteriologen aufgestellten Norm anzupassen habe. Die infolge der Divergenz mit der Klinik immer wieder unternommenen Versuche, auch bakteriologisch eine Trennung der Enteritisbakterien von den anderen Paratyphus B-Bazillen vorzunehmen, haben aber zunächst nicht zu einem eindeutigen Ergebnis geführt.

Unterschiede im kulturellen Verhalten (Babes, v. Drigalski, Fischer) haben sich bei späteren Untersuchungen (Kutscher und Meinicke, Trautmann u. a.) zunächst nicht als konstant erwiesen, und auch das serologische Verhalten hat nicht zu einer durchgreifenden Trennung Anlaß geben können. Unterschiede, die sich bei Verwendung be-

stimmter Stämme ergaben (Bock), versagten nach den Feststellungen von Uhlenhuth und Hübner, sobald die Versuche an einer sehr großen Zahl von Kulturen vorgenommen wurden.

Auch die mit der Komplementbindung (Altmann, Ballner und Reibmayer) und mittels der Anaphylaxie (Lieverato) ausgeführten Differenzierungsversuche haben zu negativen Ergebnissen geführt.

In den letzten Jahren sind nun aber gegen die Anschauung von der bakteriologischen Identität der Erreger der abdominalen Form des Paratyphus und der bei Fleischvergiftungen auftretenden Keime der Paratyphusgruppe, der sogenannten Breslaustämme, neue gewichtige Einwände erhoben worden.

In einer Reihe von Arbeiten von Reiner Müller[1]) und Bitter[2]) wurde das regelmäßige Vorkommen kultureller Unterschiede zwischen den beiden Gruppen behauptet. Ein weiterer stets vorhandener Unterschied soll darin bestehen, daß nur die Fleischvergifter im Fütterungsversuch mit Reinkulturen mauspathogen sind. Auch serologisch ist nach den Angaben Bitters eine Unterscheidung möglich [Vgl. auch Schittenhelm[3])[4]).]

Es erschien uns wünschenswert, erneut die serologische Seite der Frage einer Untersuchung zu unterziehen, und zwar mit Rücksicht darauf, daß auf Grund der Arbeiten von Weil und Felix[5]) über den Doppeltypus der Rezeptoren in der

1) R. Müller, Deutsche med. Wochenschr., 1910, p. 2387; Münch. med. Wochenschr., 1914, p. 471; Centralbl. f. Bakt., I, Ref., Bd. 42, p. 57*.

2) Bitter, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 90, p. 387; Centralbl. f. Bakt., I, Orig., Bd. 85, 1921, p. 110; ebenda, Beiheft p. 88*.

3) Schittenhelm, Münch. med. Wochenschr., 1920, p. 1309.

4) Anmerkung bei der Korrektur: Nach einer soeben erschienenen Arbeit von Manteufel und Beger (Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig., Bd. 87, p. 161) hat es „tatsächlich den Anschein, daß den von Bitter zusammengestellten Unterscheidungsmerkmalen gewisse serologische Differenzierungsmöglichkeiten entsprechen“. Da die Autoren aber nur mit ausgewählten, insbesondere mit Eselseris im Ausfällungsversuch klare Resultate erzielten, während Kaninchenimmunsera versagten, so sind sie „nicht der Ansicht, daß ein gültiger Beweis“ (für die Ansicht von Bitter) „bereits erbracht ist“. „Es bleibt“ vielmehr „abzuwarten, ob diese Differenzen zu einer Typentrennung ausreichen“ (siehe auch Anm. p. 547).

5) Weil und Felix, Wiener klin. Wochenschr., 1918, No. 36; Weil, Felix und Mitzenmacher, ebenda, 1918, No. 46; Weil und Felix, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 29, 1920.

Typhus-Paratyphusgruppe jetzt gänzlich neue Einteilungsmöglichkeiten gegeben waren.

Weil und Felix haben bekanntlich, ausgehend von ihren Untersuchungen an den bei Fleckfieber gefundenen X-Stämmen, gezeigt, daß manche Bakterien, insbesondere auch die Bakterien der Paratyphusgruppe, zwei verschiedenartige Agglutinogene enthalten, denen auch zwei verschiedene Typen von Antikörpern entsprechen. Das eine Agglutinogen ist kochbeständig, das andere wird durch Erwärmen zerstört. Die gegen das kochbeständige Antigen gerichteten Antikörper bewirken eine feinkörnige Agglutination, die gegen das hitzeempfindliche gerichteten eine grobflockige. In der Paratyphusgruppe sind in der Regel die thermolabilen Rezeptoren die Träger der strengen Spezifität, während die thermostabilen in stärkerem oder geringerem Grade auf die verschiedenen Formen übergreifen können. So gibt es z. B. stabile Rezeptoren, die den Typhus- und Paratyphus B-Bazillen gemeinsam sind, und die serologischen Beziehungen, die zwischen Typhus und Gärtner bestehen, können auf eine Identität der stabilen Rezeptoren beider Arten zurückgeführt werden.

Daß die Agglutination grob- oder feinflockig ausfallen kann, war schon öfter beobachtet[1]), aber eine Gesetzmäßigkeit dabei niemals erkannt worden. Auch über thermostabile und thermolabile Rezeptoren liegt aus früherer Zeit eine nicht unbeträchtliche Literatur vor[2]) und endlich sind auch Beziehungen zwischen Begeißelung der Bakterien und dem agglutinatorischen Verhalten schon früher behauptet worden[3]).

Die besondere Bedeutung der Untersuchungen von Weil und Felix liegt in der Aufdeckung einer engen Beziehung zwischen einem bestimmten Agglutinationstypus zu bestimmten Rezeptoren. Die Erkenntnis dieses Zusammenhanges hat sich schon jetzt als überaus fruchtbar erwiesen. Neben den vielfachen Anwendungen für die Systematik sei im Hinblick auf die nachstehenden Untersuchungen insbesondere auf die Aufschlüsse über die Bedeutung des Castellanischen Versuchs hingewiesen.

Es war nun zu prüfen, ob unter Berücksichtigung dieser Verhältnisse eine Unterscheidung der eigentlichen Paratyphus B-Bazillen von den ihnen serologisch zweifellos sehr nahestehenden Enteritisbakterien des Typus Breslau gelingen würde.

1) Friedberger, Festschrift f. Salkowski. Berlin, A. Hirschwald, 1904.

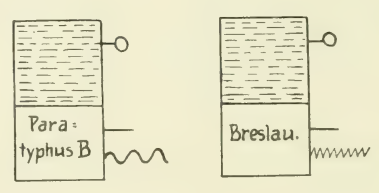
2) Joos, Scheller, Kraus und Joachim, Porges, Eisenberg und Volk u. a.

3) Malvoz, Ann. de l'Inst. Pasteur, T. 11, 1897, p. 582; Nicolle und Trénell, ebenda, T. 16, 1902, p. 562; Th. Smith und Reagh, Journ. of medical research, Vol. 10, 1904, p. 89.

Von Weil und Felix selber liegt in dieser Richtung nur ein einziger Versuch vor[1]). Weil und Felix prüften neben einem echten Paratyphusstamm einen Fleischvergifter und einen Mäusetyphus auf ihren Gehalt an thermostabilen und thermolabilen Rezeptoren. Es zeigte sich, daß die von ihnen untersuchten Stämme sowohl von den kleinflockenden wie von den großflockenden Agglutininen eines Paratyphus B-Immunserums in genau derselben Weise beeinflußt wurden wie der typische Paratyphus B.

Eine Unterscheidung im Sinne der Angaben von Bitter gelang also nicht.

Den tatsächlichen Befund von Weil und Felix können wir für bestimmte Sera bestätigen. Dieser einzige Versuch reicht aber in keiner Weise aus, um die Frage der serologischen Unterscheidbarkeit der beiden Gruppen endgültig zu entscheiden. Wir haben deshalb die Frage an einem größeren Material geprüft und dabei sowohl das Verhalten verschiedener Stämme wie auch dasjenige verschiedenartiger Sera untersucht.



gemeinsame
thermostabile
thermolabile
Rezeptoren.

Das Ergebnis der auf diese Weise vorgenommenen serologischen Analyse sei den Versuchen kurz vorangestellt. Es ließ sich in Bestätigung der bisherigen Anschauungen und insbesondere auch der Angaben von Weil und Felix fest-

1) Weil und Felix, diese Zeitschr., a. a. O. p. 82.

stellen, daß die echten Para B-Bazillen und die Fleischvergifter vom Typus „Breslau" einen wesentlichen Teil ihrer Rezeptoren gemeinsam haben, daß trotzdem aber eine serologische Unterscheidung der beiden Gruppen sehr wohl möglich ist, und zwar deshalb, weil sowohl die echten Paratyphus B-Bazillen wie die Fleischvergifter außerdem noch jeweils für sie charakteristische Rezeptoren besitzen. Einzelheiten ergeben sich aus der vorstehenden schematischen Darstellung.

Gemeinsam ist die Gesamtheit der thermostabilen Rezeptoren. Außerdem gibt es auch gemeinsame thermolabile Rezeptoren. Daneben sind nun noch thermolabile Rezeptoren vorhanden, die jeweils spezifisch sind.

Zur Aufklärung der wechselseitigen Beziehungen war es notwendig, eine ganze Reihe von Seris heranzuziehen, denn die Analyse war dadurch erschwert, daß nicht in jedem Immun- oder Patientenserum Antikörper gegen sämtliche Rezeptorentypen vorhanden sind. Ich möchte dieses Verhalten als die „Unvollständigkeit" der Immunsera bezeichnen.

Es handelt sich hier um eine Erscheinung, die längst bekannt ist, aber nicht immer genügend berücksichtigt wurde. Besonders anschaulich ergibt sich die „Unvollständigkeit" der Immunsera aus Untersuchungen von Friedberger[1]) sowie Friedberger und Moreschi[2]), die wohl zuerst an dem Beispiel der Typhusbazillen zeigten, daß bei der Heranziehung verschiedener Tierspezies zur Immunisierung eine ganz unerwartete Mannigfaltigkeit im Rezeptorenapparat der Typhusbazillen zutage tritt[3]). Bei ein und demselben Tier ist der Immunkörper in verschiedenen Stadien der Immunisierung nicht gleichartig zusammengesetzt.

Wir prüften in Auswertungs- und in Bindungsversuchen eine Reihe von echten Paratyphus B-Stämmen einerseits, Fleischvergiftern des Typus Breslau andererseits. Zur Unter-

---

1) Friedberger, Festschrift für Salkowski, 1904.

2) Friedberger und Moreschi, Berl. klin. Wochenschr., 1905.

3) Neuere Untersuchungen, die in dieser Richtung mit dem Bazillus X 19 und dem Bazillus Kreuscher von Friedberger, Zorn und Meißner angestellt worden sind, haben erneut gezeigt, wie bedenklich es ist, auf Grund der bei einer Tierspezies, Kaninchen (Kreuscher und Neukirch), gewonnenen Ergebnisse allgemeine Schlüsse zu ziehen.

Die Immunisierungsversuche bei verschiedenen Tierarten haben gezeigt, daß keineswegs die Immunsera streng spezifisch zu sein brauchen. Beim Huhn liegen die Verhältnisse ganz anders als beim Kaninchen. (Ausführliche Veröffentlichung erfolgt in nächster Zeit.)

suchung benutzten wir monovalente Immunsera, die wir uns gegen einige echte Paratyphus B-Stämme und gegen Fleischvergifter hergestellt hatten, ferner noch Sera von Patienten, die klinisch das Bild des Typhus abdominalis boten und bei denen Paratyphus B-Bazillen aus dem Blute gezüchtet worden waren [1]).

1. Untersuchungen an Immunseris.

a) „Echte“ Paratyphus B-Immunsera.

Zunächst wurde der Titer eines monovalenten agglutinierenden Kaninchenimmunserums, das durch Immunisierung mit einem echten Paratyphus B-Stamm gewonnen war, für einige echte Paratyphus B-Stämme und einige Breslaustämme bestimmt.

Versuch I.

Agglutinationstiter eines echten Paratyphus B-Immunserums für verschiedene Paratyphus B- und Breslaustämme.

Kaninchenimmunserum P 20, gewonnen durch Immunisierung mit „echtem“ Paratyphus B (Stamm 865).

	Stamm	Agglutinationstiter
Echter Paratyphus B	„Para B“	5 000
	865	10 000
	1059	5 000
	1470	500
Fleischvergifter der Breslaugruppe	Breslau	5 000
	Aertryck	2 000
	Makrele	1 000

Eine Differentialdiagnose auf Grund des Agglutinationstiters würde mit unserem Serum nur unzuverlässig ausfallen. Im Durchschnitt werden die echten Paratyphusstämme zwar stärker agglutiniert, einzelne Stämme der beiden Gruppen weisen aber den gleichen Agglutinationstiter auf.

Es war nun der Typus der Agglutination zu untersuchen.

Er läßt sich, bevor die Flocken zu Boden gesunken sind, bei Beobachtung mit der Lupe in der Regel dann gut erkennen, wenn das Serum entweder rein feinflockend oder rein grobflockend wirkt. Treten aber beide Agglutinationstypen nebeneinander auf, so können sich Schwierigkeiten

1) Für die Ueberlassung der Sera sind wir dem Direktor der Med. Klinik, Herrn Prof. Morawitz, zu Dank verpflichtet.

ergeben. Es kann z. B. nicht immer sicher festgestellt werden, ob neben eindeutig bestimmbaren groben Flocken noch feine Flocken vorhanden sind. In solchen zweifelhaften Fällen kann eine endgültige Entscheidung durch ergänzende Agglutinationsversuche mit erhitzten Bakterien sowie durch Bindungsversuche herbeigeführt werden.

Diese Methodik hat den Vorzug, daß das subjektive Moment der Beurteilung des Charakters der Flockung fortfällt und daß anstattdessen entschieden wird, ob die vorhandenen Antikörper gegen thermostabile oder gegen thermolabile Rezeptoren gerichtet sind. Es scheint überhaupt zweckmäßig, dies letztere Verhalten bei der Unterscheidung der Agglutinintypen vorzugsweise zu berücksichtigen. Wir werden demgemäß im folgenden auch von „stabilotropen" und „labilotropen" Agglutininen sprechen.

Daß das Immunkaninchenserum P 20 grobflockende Agglutinine enthielt, war mit Sicherheit bei Ablesung nach 15 Minuten zu erkennen.

Die Anwesenheit feinflockender Agglutinine ergab sich aus dem folgenden Versuch, in dem die Sera mit auf 100° erhitzt gewesenen Bazillen ausgewertet wurden.

Versuch II.

Agglutinationstiter des Serums P 20 für erhitzte Bakterien.

Kaninchenimmunserum P 20, gewonnen durch Immunisierung mit „echtem" Paratyphus (Stamm 865).

Agglutination erhitzter Bazillen (10 Minuten 100°).

	Stamm	Agglutinationstiter
	„Para B"	100
Echter Paratyphus B	865	1000
	1059	1000
	1470	1000
Fleischvergifter der Breslaugruppe	Breslau	1000
	Aertryck	1000
	Makrele	200

Beide Bakteriengruppen enthalten also thermostabile Rezeptoren. Der Titer des Serums ist auch hier gegenüber verschiedenen Stämmen verschieden hoch.

Erhitzte Bakterien wurden von den Seris im ganzen schwächer agglutiniert. Eine Unterscheidung der beiden Gruppen war auch bei Verwendung erhitzter Bakterien nicht möglich.

Im Bindungsversuch gelang jedoch mit diesem Serum eine Differenzierung mit Leichtigkeit. Durch Vorbehandlung

mit Breslaustämmen konnten nämlich die Agglutinine für Breslau völlig entfernt werden, während für Paratypus B der Titer nur ganz wenig abnahm.

Versuch III.

Ausfällung des monovalenten Paratyphusimmunkaninchenserums P 20 (hergestellt mit dem echten Paratyphus B-Stamm 865) mit einem Breslaustamm (Makrele).

Eine 24-stündige Agarplattenkultur des Stammes Makrele wird mit 5,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt; die Abschwemmung wird zentrifugiert. Das Sediment wird mit 5,0 ccm des hundertfach verdünnten Serums gut gemischt; Digestion 2 Stunden bei 37 Grad; während dieser Zeit wird noch wiederholt durchgemischt. Dann wird zentrifugiert und der Abguß ausgewertet.

Ablesung nach 2 Stunden.

	Serum			
	unbehandelt		ausgefällt mit Makrele	
1 : 100	+++	++	++	—
1 : 200	+++	++	++	—
1 : 500	+++	++	++	—
1 : 1000	++	++	+	—
1 : 2000	++	(+)	(+)	—
1 : 5000	(+)	±	(±)	—
1 : 10 000	—	—	—	—
	Paratyphus 865	Makrele	Paratyphus 865	Makrele

Ganz dasselbe Ergebnis hatte nun auch die Vorbehandlung des Serums mit einem echten Paratyphusstamm. Die Breslauagglutinine waren nach einmaliger Ausfällung des Serums verschwunden, während die Paratyphus B-Bazillen noch in sehr starken Verdünnungen ausgeflockt wurden.

Versuch IV.

Ausfällung des Serums P 20 mit einem echten Paratyphusstamm (Stamm 865).

Technik wie oben.

	Serum			
	unbehandelt		ausgefällt mit Pa. B 865	
1 : 100	+++	++	++	—
1 : 200	+++	++	++	—
1 : 500	+++	++	(+)	—
1 : 1000	++	++	(+)	—
1 : 2000	++	(+)	(+)	—
1 : 5000	(+)	(±)	±	—
1 : 10 000	—	—		—
	Paratyphus 865	Makrele	Paratyphus B 865	Makrele

Ein weiterer Versuch zeigt das Ergebnis bei Ausfällung mit Paratyphus B und Breslau. Prüfung mit mehreren Stämmen.

Versuch V.

Ausfällung des monovalenten Paratyphus B Immunserums P 20 durch einen echten Paratyphus B- und einen Breslaustamm. Prüfung der ausgefällten Sera an sieben Paratyphus B- und sechs Breslaustämmen.

Zur Vorbehandlung diente 1) Stamm 865 (echter Paratyphus), 2) Stamm Makrele (Breslau).

Technik wie oben. Serumverdünnung 1 : 100.

Die Abgüsse werden ohne weitere Verdünnung mit den einzelnen Stämmen angesetzt.

Ausfällung mit echtem Paratyphus B (Stamm 865) und Breslau (Stamm Makrele).

	Stamm	Serumverdünnung 1 : 100		
		unbehandelt	Ausgefällt mit	
			Paratyphus B	Breslau
Echter Paratyphus B	865	+++	++	++
	963	+++	+++	++
	1059	+++	+++	++
	1419	+++	+++	++
	1470	+++	+++	+++
	1539	+++	+++	++
	1665	+++	+++	+
Breslau	Makrele	+++	—	—
	Breslau	+++	—	—
	Aertryck	++	—	—
	Greifswald	++	—	—
	Neunkirchen	++	—	—
	Düsseldorf	++	—	—

Mit Hilfe des ausgefällten Serums ist es also möglich, die untersuchten Stämme ganz scharf in 2 Gruppen zu trennen, auf der einen Seite die echten Paratyphus B-Stämme, auf der anderen die Enteritisstämme.

Die Auswahl der zur Bindung verwandten Stämme ist auf das Ergebnis nicht ganz ohne Einfluß, da manche Stämme überhaupt schwächer binden als andere. Stets kam aber dabei zum Ausdruck, daß die Agglutinine für Fleischvergifter sich leichter aus dem Serum entfernen lassen.

Nun bestand zwischen den benutzten Fleischvergiftern und den Paratyphusstämmen ein Unterschied hinsichtlich des Alters der Stämme: Die Fleischvergifter waren, wie schon aus den bekannten Namen hervorgeht, sämtlich vor sehr langer Zeit gezüchtet worden, so z. B. der Stamm Breslau im Jahre 1893.

Die Paratyphusstämme dagegen waren sämtlich im Laufe des letzten Jahres, zum Teil erst vor wenigen Wochen oder

Monaten, aus dem Körper in unserem Institut gewonnen worden.

Es war deshalb notwendig, den Versuch noch durch Einbeziehung einiger frisch gezüchteter Fleischvergifter zu ergänzen. Es standen dazu 5 uns in liebenswürdiger Weise von Herrn Prof. Bitter, Kiel, überlassene Stämme zur Verfügung, von denen 2 aus dem Jahre 1920, 3 aus dem Jahre 1921 stammten.

Das Verhalten dieser Stämme gegenüber dem Paratyphusimmunserum nach Ausfällung mit einem der älteren Fleischvergifter bzw. einem echten Paratyphus zeigt der folgende Versuch.

Versuch VI.

Ausfällung des Paratyphusimmun-Kaninchenserums P 20 mit einem Breslaustamm und einem echten Paratyphus B.

Prüfung an frisch gezüchteten Breslaustämmen.

Serumverdünnung 1 : 100. Technik der Ausfällung wie oben.

a) Serum unbehandelt.

b) Serum ausgefällt mit Fleischvergifter „Breslau alt“.

c) Serum ausgefällt mit echtem Paratyphusstamm 1470.

Geprüfte Stämme: Breslau I—V.

I. Isolierter Fall von Gastroenteritis. Erreger aus dem Blut des Patienten isoliert. Schuldiges Nahrungsmittel unbekannt.

II. Gruppenerkrankung von Gastroenteritis nach dem Genuß von Teewurst, isoliert aus dem Stuhl eines Patienten.

III. Isolierter Fall von schwerer Gastroenteritis mit tödlichem Ausgang. Isoliert aus dem Stuhle des Patienten. Schuldiges Nahrungsmittel unbekannt.

IV. Gruppenerkrankung von Gastroenteritis nach dem Genuß von Hackfleisch. Isoliert aus einer ungenügend durchgebratenen Frikadelle.

V. Isolierter Fall von Gastroenteritis, gezüchtet aus dem Stuhle des Patienten[1]).

Prüfung des Serums und der Abgüsse.

Fleischvergifter Bitterstamm	I	II	III	IV	V
Serum 1:100 unbehandelt	++	+++	+++	++	++
ausgefällt mit Breslau (Stamm Breslau, Original)	—	± ?	—	± ?	—
ausgefällt mit Paratyphus B (Stamm 1470)	—	—	—	—	—

Ablesung nach 20 Stunden.

1) Die Angaben zu I—V laut Mitteilung von Herrn Prof. Bitter.

Die Vorbehandlung mit dem Original-Breslaustamm hat also auch die Agglutinine für die frisch gezüchteten Stämme herausgenommen. Diese verhalten sich nicht anders als die alten Breslaustämme. Auch die Vorbehandlung mit dem echten Paratyphus B-Stamm hat ebenso gewirkt wie in den früheren Versuchen.

Das Immunserum wurde nun auch mit einigen der frischen Breslaustämme ausgefällt und alsdann an einer Reihe von Paratyphus B- und Enteritisstämmen des Typus Breslau geprüft.

Genau wie bei der Ausfällung mit den älteren Stämmen waren nur für echte Paratyphus B-Stämme, nicht aber für Enteritisstämme Agglutinine in dem Immunserum zurückgeblieben.

Das verschiedene Verhalten der echten Paratyphus B-Stämme und der Enteritisstämme kann demnach nur so gedeutet werden, daß wirklich zwischen den beiden Gruppen als solchen serologische Unterschiede bestehen.

In demselben Sinne fielen Versuche mit einem anderen Serum aus, einem Paratyphus B Eselimmunserum, das im Gesundheitsamt hergestellt war. Ueber die Bakterien der Immunisierung ist uns nichts bekannt.

In Bindungsversuchen mit Paratyphus B- und Breslaustämmen gelang es leicht, das Serum für die letzteren unwirksam zu machen, während einmalige Vorbehandlung den Titer für echte Paratyphus B-Bazillen nur abschwächte. Der folgende Versuch VII gibt ein Beispiel dafür. Hier war der ursprüngliche Titer für den Fleischvergifterstamm ebenso hoch wie für den echten Paratyphus B-Stamm. Ausfällung mit dem Fleischvergifter schwächte die Agglutinine für Paratyphus B nur mäßig, Ausfällung mit einem Paratyphus B-Stamm erheblich. Beide Stämme aber nahmen wie in den Versuchen mit dem monovalenten Serum sämtliche Agglutinine für den Fleischvergifter heraus.

Die bisherigen Versuche erlauben es, zwischen echtem Paratyphus und den Breslaustämmen im Sinne der Seitenkettentheorie eine Rezeptorengemeinschaft anzunehmen. Sie ist aber nur eine teilweise. Die Rezeptoren der Breslaugruppe sind nach den bisherigen Ergebnissen zwar sämtlich auch in den echten Paratyphus B-Stämmen enthalten. Daneben aber gibt es Rezeptoren der echten Paratyphus B-Stämme, die nur diesen zu eigen, also streng spezifisch sind.

Versuch VII.

Ausfällungsversuch mit einem zweiten Paratyphus B-Immunserum „Paratyphus B-Eselserum Ges.-Amt".

5,0 ccm der Serumverdünnung, 1 : 100 wurden ausgefällt mit dem Sediment der Abschwemmung von 3 Schrägagarröhrchen.

Serumverdünnung	Serum unbehandelt		Serum ausgefällt mit echtem Paraty B (Stamm 3712)		Serum ausgefällt mit Breslaustamm „Makrele"	
	geprüfte Bakterien: Para B	Makrele	Para B	Makrele	Para B	Makrele
1 : 100	+++	+++	±	—	++	—
1 : 200	++	+++	±	—	+	—
1 : 500	++	+++	—	—	+	—
1 : 1 000	++	+++	—	—	(+)	—
1 : 2 000	++	++	—	—	(+)	—
1 : 5 000	+	+	—	—	±	—
1 : 10 000	(+)	(+)	—	—	—	—
1 : 20 000	(+)	(+)	—	—	—	—
1 : 50 000	—	—	—	—	—	—

Ablesung nach 2 Stunden.

(+) = Agglutination nur bei Ablesung mit der Lupe deutlich.

Diese spezifischen Agglutinine haben noch eine besondere Eigentümlichkeit; sie sind nämlich durch eine geringere Avidität auch zu den echten Paratyphus B-Bazillen ausgezeichnet als diejenige Agglutininquote, die bei einmaliger Vorbehandlung mit echten Bazillen sich aus dem Serum entfernen läßt.

Das geht aus dem Versuch hervor, wo das mit Paratyphus B-Bazillen vorbehandelte Serum nur für die Fleischvergifter unwirksam wurde (Versuch V).

Auch bei mehrfach wiederholter Vorbehandlung mit Fleischvergiftern und Paratyphus B-Bazillen gelang es nicht, das Serum für echte Paratyphus B-Bazillen unwirksam zu machen.

Das ergibt sich aus dem folgenden Versuch:

Im Versuch VIII wurde das auch in den vorhergehenden Versuchen benutzte Kaninchenserum P 20 weit energischer, nämlich 5mal hintereinander mit Bazillen vorbehandelt, und zwar einerseits mit verschiedenen Breslaustämmen, andererseits mit echten Paratyphus B-Stämmen.

Versuch VIII.

Wiederholte Ausfällung eines echten Paratyphus B-Immunserums.

Immunkaninchenserum P 20 (hergestellt mit dem echten Paratyphus B-Stamm 865) wird wiederholt einerseits mit Breslaustämmen, andererseits mit echten Paratyphus B-Stämmen ausgefällt.

Je eine Agarplattenkultur wird mit 5,0 physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt; die Abschwemmung wird zentrifugiert und der Bodensatz mit 5,0 des 50-fach verdünnten Serums gut durchgemischt. Digestion 1 Stunde bei 37°. Dann wird scharf zentrifugiert und der Abguß mit neuem Bakteriensediment ebenso behandelt. Im ganzen wird 5mal ausgefällt: zur Ausfällung dienen

a) 4 verschiedene Breslaustämme: Makrele (2 Agarplatten), Neunkirchen, Düsseldorf, Aertryck.

b) 5 verschiedene echte Paratyphus B-Stämme: 1534, 1412, 1419, 963, 1059.

Daneben wird angesetzt:

Serum 1 : 50 unbehandelt.

Prüfung der Abgüsse gegen verschiedene Stämme.

	Bakterienstämme	Serum unbehandelt	Serum ausgefällt mit	
			Breslau	echtem Paratyphus
Breslaugruppe	Greifswald	+++	—	—
	Makrele	+++	—	—
	Düsseldorf	+++	—	—
Echter Paratyphus B	865	+++	+	(+)
	„Paraty B“	+++	++	(+)
	1534	+++	+	—

In diesem Versuch hat also die fünfmalige Vorbehandlung mit Bakterien zu einem ganz ähnlichen Ergebnis geführt wie in den früheren Versuchen die nur einmalige. Nur die Agglutinine für die Fleischvergifter sind stets völlig gebunden worden; dagegen sind die Agglutinine für die echten Paratyphus B-Bazillen viel schwerer völlig zu binden, wenn auch in diesem Versuch deutlich zu erkennen ist, daß eine teilweise Bindung jedenfalls stattgefunden hat. Dabei hat die Vorbehandlung mit Breslau erheblich schwächer gewirkt als die Ausfällung mit echten Paratyphus B-Bazillen.

Ausfällung mit erhitzten Bakterien.

In den bisherigen Versuchen wurde der Weilsche Doppeltypus der Rezeptoren und Agglutinine noch nicht ausdrücklich

berücksichtigt. Um hier Aufklärung zu gewinnen, wurden im Bindungsversuche auch erhitzte Bakterien geprüft.

Als Beispiel bringen wir nachstehend aus einer größeren Reihe von Versuchen, in denen verschiedene Stämme zur Bindung benutzt wurden, das folgende Protokoll. Als Immunserum diente in diesem Versuch das schon früher benutzte Serum P 20.

Versuch IX.

Monovalentes Paratyphus B-Kaninchenimmunserum P 20.

Zweimalige Ausfällung mit erhitzten echten Paratyphus B-Bazillen (Stamm 1470).

Agglutination von 11 echten Para B- und 11 Breslaustämmen.

Je 5,0 der Serumverdünnung 1 : 50 werden mit den Bakterien einer 24-stündigen Agarplattenkultur ausgefällt.

Die Agarplatte (Petrischale) wird mit 5,0 ccm physiologischer NaCl-Lösung abgeschwemmt und die Aufschwemmung scharf zentrifugiert; zum Bodensatz wird 5,0 ccm NaCl-Lösung zugesetzt. Nach Aufschütteln wird die Aufschwemmung 10 Minuten bei 100° im Wasserbad gehalten. Alsdann wird wiederum zentrifugiert und zum Sediment 5,0 ccm der Serumverdünnung hinzugesetzt. Nach guter Durchmischung 1 Stunde Digestion bei 37°. Alsdann werden die Bakterien ausgeschleudert und die Ausfällung des Serums mit neuen Bakterien in gleicher Weise wiederholt.

Prüfung des unbehandelten und des ausgefällten Serums.

Echte Paratyphus B-Bazillen			Breslaugruppe		
Stamm	unbehandelt	nach Ausfällung	Stamm	unbehandelt	nach Ausfällung
865	grob (+ fein)[1]	grob	Makrele	fein	—
963	dgl.	„	Aertryck	„	—
1419	„	„	Breslau alt	„	—
2458	„	„	Greifswald	„	—
2589	„	„	Neunkirchen	„	—
1420	„	„	Düsseldorf	„	—
2441	„	„	Breslau I	„	—
1799	„	„	„ II	„	—
2381	„	„	„ III	„	—
2590	„	„	„ IV	„	—
„Paratyphus B“	„	„	„ V	„	—

Die Tabelle zeigt, daß das Immunserum grobe und feine Agglutinine enthält. Die groben Agglutinine kommen aber nicht gleichmäßig gegenüber allen Stämmen zur Geltung. Ein

1) Die Anwesenheit feinflockender Agglutinine wurde durch Agglutinationsversuche mit erhitzten Bakterien sichergestellt.

Teil, nämlich sämtliche Vertreter der Breslau-Gruppe, werden vielmehr ausschließlich in feinen Flocken ausgefällt. Die serologische Verschiedenheit der beiden Bakteriengruppen kommt also bei Berücksichtigung des Agglutinationstypus ohne weiteres, d. h. im einfachen Agglutinationsversuch deutlich zum Ausdruck.

Die Vorbehandlung des Immunserums mit erhitzten Bazillen hat zur Folge gehabt, daß die stabilotropen (= feinflockenden) Agglutinine verschwunden sind. Das Serum enthält nunmehr nur noch labilotrope Antikörper. Der Unterschied zwischen den echten Paratyphus B-Bazillen und den Breslaustämmen tritt hier noch klarer hervor als bei dem unbehandelten Serum, denn die ersteren werden noch unverkennbar grob, die letzteren dagegen überhaupt nicht mehr agglutiniert, auch nicht bei Ablesung nach 24 Stunden.

Dagegen war die überwiegende Mehrzahl der echten Paratyphus B-Stämme bereits nach 15 Minuten deutlich agglutiniert. Dies entspricht der Angabe von Weil und Felix, wonach die grobe Agglutination in der Regel sehr rasch auftritt. Nur bei einzelnen Stämmen war der Beginn der Agglutination erst nach 30—60 Minuten zu beobachten.

Der Ausfall des Versuches erlaubt den Schluß, daß die thermostabilen Rezeptoren der sämtlichen untersuchten Stämme untereinander übereinstimmen, soweit gegen sie in dem Immunserum P 20 Antikörper vorhanden sind.

Daneben müssen die echten Paratyphus B-Bazillen thermolabile Rezeptoren besitzen, die den Breslaustämmen nicht zukommen.

b) Untersuchungen an Breslauimmunseris.

Es war nun die Frage, ob mit Hilfe von monovalenten Immunseris, die durch Vorbehandlung mit Breslaustämmen erzeugt waren, sich auch umgekehrt für die letzteren Bakterien spezifische Rezeptoren nachweisen lassen würden.

Für die Versuche wurden monovalente im hiesigen Institut hergestellte Kaninchenimmunsera benutzt, die durch mehrfache Vorbehandlung mit vier verschiedenen Breslaustämmen, darunter dem uns von Herrn Prof. Bitter-Kiel freundlichst überlassenen Stamm „Makrele“ gewonnen waren. Außerdem

hatte uns Herr Prof. Bitter liebenswürdigerweise ein monovalentes im folgenden als „Breslau“ bezeichnetes Kaninchenimmunserum zur Verfügung gestellt.

Zunächst seien wiederum die Titerwerte eines solchen Serums für Breslaustämme und für echte Paratyphus B-Bazillen angeführt.

Versuch X.

Agglutinationstiter eines Breslauimmunserums für Breslau und Paratyphus.

Kaninchenimmunserum T 62, gewonnen durch Immunisierung mit Breslaustamm Makrele.

Agglutination lebender Bazillen.

	Stamm	Agglutinationstiter
Fleischvergifter der Breslaugruppe	Breslau	2000
	Aertryck	1000
	Makrele	1000
Echter Paratyphus B	„Para B“	1000
	865	500
	1059	1000
	1470	1000

Ablesung nach 2 Stunden.

Für die erhitzten Bazillen waren die Titerwerte etwas geringer. Unterschiede zwischen Fleischvergiftern und echten Paratyphus B-Bazillen traten nicht hervor.

Eine sichere Einordnung der geprüften Stämme ist auf Grund der Auswertung mit Hilfe des hier benutzten Serums nicht möglich. Durchschnittlich scheint allerdings das Serum die Fleischvergifter stärker zu agglutinieren als die echten Paratyphus B-Stämme. Es dürfte kein Zufall sein, daß der am stärksten agglutinierte Stamm ein Fleischvergifter ist, der am schwächsten agglutinierte ein echter Paratyphusstamm.

Der folgende Versuch zeigt das Verhalten eines echten Paratyphusstammes und eines Fleischvergifters gegenüber diesem Serum „Breslau“. Das Serum ist hier gleichzeitig auch für erhitzte Bakterien ausgewertet worden. (Siehe Versuch XI.)

Auch in diesem Versuch besteht bei den frischen Bakterien ein kleiner Unterschied zugunsten des homologen Stammes.

Versuch XI.

Agglutination frischer und erhitzter Paratyphus B- und Enteritis-Breslau-Bakterien durch Serum „Breslau Bitter“.

Bakterien		Serumverdünnung							
		1 : 100	1 : 200	1 : 500	1 : 1000	1 : 2000	1 : 5000	1 : 10 000	1 : 20 000
Paratyphus B	frisch	+++	++	++	(+)	(+)	(+)	—	
Breslau	frisch	+++	++	++	++	++	+	(+)	—
Paratyphus B	100°	+	+	(+)	(+)	(+)	—	—	—
Breslau	100°	++	+	(+)	(+)	—	—	—	—

Ablesung nach 20 Stunden.

Bei den erhitzten Bakterien ist dagegen ein kleiner Unterschied im umgekehrten Sinne vorhanden.

Das Verhalten der erhitzten Bakterien erweist, daß im Serum feinflockende Agglutinine gegenüber beiden Gruppen auftreten.

Eine Unterscheidung der beiden Gruppen mit Hilfe des Verhaltens der erhitzten Stämme gelang mit dem Serum „Breslau“ ebensowenig wie in den früheren Versuchen. Neben den feinflockenden Agglutininen enthielten sowohl das Serum „Breslau“ wie das Serum T 20 auch grobflockende Agglutinine für die Breslaustämme, wie die Beobachtung mit der Lupe ergab.

Weitere Aufschlüsse sollten wiederum Bindungsversuche geben.

Sie wurden zunächst mit Breslaustämmen angestellt. Diese Stämme entfernten sämtliche Agglutinine aus den Seris; also nicht nur die für die Fleischvergifter, sondern auch die für echte Paratyphus B-Stämme.

Eine besondere Schwierigkeit, die Agglutinine völlig zu entfernen, bestand im Gegensatz zu den Versuchen mit echtem Paratyphus B-Immunserum hier nicht. Auf die Wiedergabe von Versuchsprotokollen kann mit Rücksicht auf die Aehnlichkeit mit den früheren Versuchen verzichtet werden. Dagegen sei nachstehend ein Ausfällungsversuch mit Paratyphus B-Bakterien angeführt:

Versuch XII.

Zweimalige Ausfällung eines Breslauimmunserums durch lebende Paratyphus B-Bazillen.

Kaninchenimmunserum T 62, gewonnen durch Immunisierung mit einem Fleischvergifter des Breslautypus (Stamm Makrele).

Titer des Serums für den homologen Stamm 1:2000.

Ausfällungsversuch mit echtem Paratyphus B (Stamm 865).

Serumverdünnung 1:20.

Bakterien	unbehandelt	ausgefällt mit echtem Paratyphus B
Breslaugruppe		
Makrele	+++ g + f	+ g
Breslau	+++ g + f	+ g
Aertryck	+++ g + f	++ g
Echter Para B		
865	+++ f	—
1273	+++ f	—
1470	+++ f	—

Ablesung nach 2 Stunden bei 37°.

g = grobe Flocken, f = feine Flocken.

Wie der Versuch zeigt, läßt hier auch das monovalente Breslauimmunserum einen deutlichen Unterschied der geprüften Paratyphus B-Stämme von den Breslaustämmen erkennen.

In Analogie zu den Versuchen mit monovalentem Paratyphusserum werden auch hier nur die homologen, diesmal also die Bakterien der Breslaugruppe in feinen und groben Flocken agglutiniert, die heterologen dagegen nur in feinen Flocken[1]).

Die Ausfällung mit echten Paratyphus B-Bazillen hat das Immunserum zu einem streng spezifischen, und zwar rein grobflockenden gemacht.

Es müssen demnach auch die Bakterien der Breslaugruppe, die in diesem Versuch geprüft wurden, spezifische thermolabile Rezeptoren besitzen.

1) Die spezifischen grobflockenden Agglutinine waren bei den beiden Seris in stärkerer Verdünnung nicht mehr nachzuweisen. Bei Anwendung einer Serumverdünnung 1:100 gelang es sowohl durch Ausfällung mit Breslaustämmen, wie mit echtem Paratyphus, sämtliche Agglutinine aus dem Immunserum zu entfernen.

Bei ausschließlicher Anwendung dieser Sera in stärkeren Verdünnungen hätten sich demnach die spezifischen thermolabilen Rezeptoren dem Nachweis entzogen.

Dagegen bestehen auf Grund der bisherigen Versuche keine Anhaltspunkte dafür, daß Paratyphus- und Breslau-Bazillen in ihren thermostabilen Rezeptoren sich irgendwie unterscheiden.

Nach dem bereits oben erwähnten Versuch von Weil und Felix mußte nun angenommen werden, daß außer den differenten auch noch den beiden Gruppen gemeinsame thermolabile Rezeptoren existieren. Unsere bisherigen Versuche haben dafür keinen Anhaltspunkt gegeben. Daß sie aber vorhanden sind, ergab sich aus Versuchen mit anderen Breslau-Immunseris.

Angeführt sei hier nur ein Versuch mit dem Immunserum T 21, das durch Vorbehandlung eines Kaninchens mit dem uns von Bitter überlassenen Breslaustamm III (siehe Versuch VI) gewonnen war.

Versuch XIII.

Ausfällungsversuch mit Breslauserum.
Kaninchenimmunserum T 21.
Bindungsversuch mit erhitzten Breslaubazillen (Stamm Makrele).
Serumverdünnung 1:100; Technik wie oben.

Serum-verdünnung	Serum			
	unbehandelt		ausgefällt mit Makrele 100°	
	Paratyphus (Stamm 1470)	Breslau (St. Aertryck)	Paratypus (Stamm 1470)	Breslau (St. Aertryck)
1:50	+++ g+f	+++ g+f	++ g	++ g
1:100	+++	+++	(+)	++
1:200	++	++	(+)	+
1:500	++	++	(+)	+
1:1000	(+)	+	(±)	+
1:2000	(+)	+	—	+
1:5000	(±)	(+)	—	(±)

Ablesung nach 2 Stunden bei 37°.

Hier sind im Serum grobe Agglutinine gegen Breslau und Paratyphus B enthalten. Daß es sich wenigstens zum Teil um nicht streng spezifische, sondern um den beiden Gruppen gemeinsame labilotrope Agglutinine handelt, zeigte der hier nicht wiedergegebene Ausfällungsversuch mit lebenden Paratyphus B-Bazillen. Nach dieser Ausfällung enthielt das Serum kein Agglutinin mehr für Paratyphus B. Aber

auch der Titer der grobflockenden Agglutinine für Breslau war von 1 : 2000 auf 1 : 500 herabgesetzt.

Wiederholung des Versuches mit je 6 Breslau- und Paratyphus B-Stämmen fiel eindeutig in demselben Sinne aus.

Nur einer der Stämme fiel insofern aus der Reihe heraus, als er auf die gemeinsamen labilotropen Agglutinine nicht ansprach. Nach seiner Reaktion mit den spezifischen grobflockenden Agglutininen verhielt er sich aber entsprechend seiner Herkunft wie ein echter Paratyphus B-Stamm.

Versuch XIV.

Ausfällung eines Breslauimmunserums mit lebenden Bakterien.

Zweimalige Ausfällung des monovalenten Kaninchenimmunserums T 21 (gewonnen durch Immunisierung mit dem Stamm Breslau III) mit dem Paratyphus B-Stamm 865 lebend.

Technik der Vorbehandlung wie oben. Prüfung des ausgefällten Serums gegen 6 Breslau und 6 echte Paratyphus B-Stämme.

Serumverdünnung 1 : 100.

Breslaugruppe	Serum		Echte Paratyphus B-Bazillen	Serum	
Stamm	unbehandelt	nach Ausfällung	Stamm	unbehandelt	nach Ausfällung
Greifswald	g (+ f)	grob	1419	g (+ f)	—
Neunkirchen	„	„	2590	„	—
Breslau alt	„	„	2381	„	—
Makrele	„	„	2498	„	—
Breslau IV	„	„	1799	„	—
Breslau III	„	„	4113	fein	—

In diesem Versuch hat der Paratyphus B-Stamm dem Immunserum die Gesamtheit der feinflockenden und einen Teil der grobflockenden Agglutinine entzogen. Damit ist das Serum für die 6 echten Paratyphus B-Stämme unwirksam geworden. Dagegen werden die 6 Breslaustämme immer noch, und zwar rein in groben Flocken, ausgefällt.

Die bisherigen Versuche geben über das gegenseitige Verhältnis der geprüften echten Paratyphus B- und Breslaustämme folgenden Aufschluß:

Beide Gruppen besitzen thermostabile und thermolabile Rezeptoren.

Mit dem monovalenten Breslauimmunserum lassen sich ebenso wie früher mit den monovalenten Paratyphus B-Immunseris ausschließlich thermostabile Rezeptoren nachweisen, die für beide Bakteriengruppen identisch sind.

Ein Anhaltspunkt für das gleichzeitige Vorhandensein differenter thermostabiler Rezeptoren hat sich nicht ergeben.

Es kann aber naturgemäß nicht ausgeschlossen werden, daß sich mit Hilfe noch anderer Immunsera neben den identischen thermostabilen Rezeptoren auch noch andersartige aufzeigen lassen.

Dagegen sind die thermolabilen Rezeptoren zum Teil voneinander verschieden und für Paratyphus B-, bzw. die Breslaugruppe streng spezifisch, zum Teil unspezifisch.

Zur Veranschaulichung sei auf die oben gegebene schematische Skizze verwiesen, die die geschilderten Verhältnisse wiedergibt (p. 516).

2. Untersuchung der Sera von Paratyphus B-Kranken.

Die Untersuchungen von Weil und Felix bei Fleckfieber und die daran anknüpfenden Arbeiten anderer Autoren haben erneut die Wichtigkeit einer strengen Scheidung von Immunserum und Krankenserum erwiesen.

Wir haben deshalb auch eine Reihe von Patientenseris untersucht. Ueber das Verhalten der Patientensera hinsichtlich ihres Gehaltes an grob- und feinflockenden Agglutininen liegen bisher für Paratyphus nur einzelne Angaben von Weil und Felix[1]) vor. Sie beschränken sich im wesentlichen auf einen Vergleich mit den seither von Rotky[2]) eingehender untersuchten Seris Typhuskranker. Ihre Untersuchungen, die, wie die Autoren selbst betonen, sich allerdings nur auf eine kleine Anzahl von Seris beziehen, machen es wahrscheinlich, daß das Auftreten grobflockender Agglutinine jeweils spezifisch für eine Typhus- bzw. Paratyphusinfektion ist.

Unsere Untersuchungen bewegten sich in anderer Richtung. Sie sollten einerseits eine Nachprüfung der mit Hilfe von Immunseris gewonnenen Anschauungen über den Rezeptorenapparat der Paratyphusbazillen- bzw. der Breslaugruppe ermöglichen. Andererseits war es von Interesse festzustellen, wieweit überhaupt beim Erkrankten die Agglutininbildung gegen die verschiedenartigen Rezeptoren zustande kommt.

1) Weil und Felix, Zeitschr. f. Immunitätsf., a. a. O.

2) Rotky, Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig., Bd. 87, 1921, p. 16.

Untersucht wurden 12 Sera von Patienten, und zwar bisher lediglich von solchen, die an der typhösen Form des Paratyphus erkrankt waren [1]). Sera von Enteritispatienten standen leider nicht zur Verfügung.

Zunächst wurde der Agglutinintiter zweier Patientensera gegenüber einer Reihe von Stämmen der beiden zu untersuchenden Gruppen geprüft.

Versuch XV.

Agglutinationstiter von Patientenseris für echte Paratyphus- und für Breslaustämme.

Patientenserum 1902, entnommen ungefähr am 14. Krankheitstag; aus dem Blut waren Paratyphus B-Bazillen gezüchtet worden, Krankheitsverlauf typhusartig. Auswertung des Serums gegen 6 echte Paratyphusstämme und 6 Fleischvergifter. Die Zahlen bezeichnen die Endtiter nach 2 Stunden bei 37° und nach 20-stündigem Verweilen im Zimmer.

Patientenserum 2053; typhusartiges Krankheitsbild. Widal für Typhus 1 : 100, für Paratyphus B 1 : 2000.

	Stamm	Agglutinationstiter			
		Patientenserum 1902		Patientenserum 2053	
Echte Paratyphus B-Bazillen	865	100	200	500	1000
	963	100	200	.	.
	1059	100	100	.	.
	1419	50	500	1000	1000
	1470	100	500	1000	1000
	1534	500	1000	1000	1000
	1665	.	.	200	1000
	„Para B“	.	.	1000	2000
Breslaustämme	Breslau	100	500	1000	2000
	Aertryck	50	50	1000	1000
	Makrele	50	200	200	1000
	Düsseldorf	50	200	500	500
	Greifswald	50	100	500	500
	Neunkirchen	50	200	200	500
Ablesung nach Stunden		2	20	2	20

Das Ergebnis entspricht ganz dem von Versuch I mit einem monovalenten echten Paratyphus B-Immunserum. Die Fleischvergifter werden im Durchschnitt schwächer agglutiniert.

1) Es handelte sich hier zum Teil um Fälle der typhösen Form des Paratyphus aus einer kleinen Epidemie, die in Greifswald herrschte. Die Ermittlungen haben hier als gemeinsame Quelle für die Mehrzahl der Fälle auf eine Fleischerei hingewiesen, in der die Tochter des Fleischers Paratyphus B-Bazillenträgerin war.

eine Differentialdiagnose des einzelnen Stammes ist aber mit Hilfe eines Patientenserums ebensowenig möglich, wie mit dem Immunserum in Versuch I.

Auch andere Patientensera agglutinierten im Durchschnitt die ersten Stämme besser. Die einzelnen Stämme verhalten sich dabei recht verschieden. Der Stamm Aertryck, der im obenstehenden Versuch mit dem Serum 1902 nur schwach reagierte, wurde von anderen Patientenseris bei Versuchen, die ein halbes Jahr vorher angestellt waren, besonders gut ausgeflockt.

Die Untersuchung erhitzter Bakterien bot nichts Neues. Der Titer für erhitzte Bakterien ist regelmäßig herabgesetzt. Das hängt damit zusammen, daß die Sera neben den feinflockenden stets noch grobflockende Agglutinine enthalten und daß der „grobflockige" Titer meist höher ist als der „feinflockige".

Außerdem kann das Erhitzen auch die Ausflockbarkeit der Bakterien gegenüber den feinflockenden (stabilotropen) Agglutininen herabsetzen.

Die grobflockenden (labilotropen) Agglutinine waren sowohl gegen echte Paratyphus B-Bazillen wie gegen Breslaubakterien wirksam, aber jeweils nur gegen manche Stämme. Verschiedene Sera verhielten sich im einzelnen verschieden. Es schien zunächst, als ob hier durchaus unregelmäßige Verhältnisse beständen. Die Analyse durch systematische Bindungsversuche führte aber eine Aufklärung herbei.

Zur Ausfällung der Sera dienten einmal erhitzte Bakterien der beiden Gruppen, ferner lebende Breslaustämme. Geprüft wurden die Sera vor und nach der Ausfällung an einer Reihe von echten Paratyphus B-Stämmen und an Breslaustämmen.

Die Erschöpfung der Sera mit erhitzten Bakterien bezweckte den isolierten Nachweis grober Agglutinine. In der Regel verwandten wir hierfür erhitzte echte Paratyphus B-Bazillen. Es zeigte sich aber in Uebereinstimmung mit unseren bisherigen Feststellungen, daß die Vorbehandlung mit erhitzten Breslaustämmen ganz ebenso wirkt.

Es mußte mit dieser Art der Ausfällung zunächst gelingen, überhaupt das Auftreten grober Agglutinine nachzuweisen.

Dies war wichtig, denn es konnte so die mit der Lupe vorgenommene Bestimmung des Agglutinationstypus kontrolliert werden.

Ferner aber konnte durch Prüfung der Abgüsse an Vertretern der beiden Bakteriengruppen festgestellt werden, ob die grobflockenden Agglutinine des Patientenserums sich gegenüber verschiedenen Stämmen verschieden verhalten bzw. eine Differenzierung der beiden Gruppen in derselben Art ermöglichen, wie manche Immunsera.

Enthielt z. B. das Patientenserum von grobflockenden Agglutininen lediglich solche, die nur die echten Paratyphus B-Bazillen beeinflussen, so mußte nach der Ausfällung mit erhitzten Bakterien zwar noch eine Agglutination der echten Paratyphus B-Bazillen, nicht aber der Breslaubakterien eintreten.

Eine Unklarheit mußte aber bestehen bleiben, wenn grobflockende Agglutinine gegen Vertreter der beiden Gruppen im Serum enthalten waren.

In diesem Falle mußte weitere Aufklärung von der Ausfällung mit lebenden Breslaubakterien erwartet werden, denn diese letzteren entfernen aus dem Patientenserum nicht nur die Gesamtheit der feinflockenden Agglutinine, sondern auch die für sie homologen grobflockenden Agglutinine. Sollte ein so ausgefälltes Serum noch echte Paratyphus B-Bazillen agglutinieren, so müßte es Agglutinine enthalten, die für diese streng spezifisch sind.

Die nach diesen Gesichtspunkten vorgenommene Analyse ergab, daß sich verschiedene Typen der Sera aussondern lassen. 2 Sera, die sich sehr ähnlich verhielten, zeigt der folgende Versuch XVI.

Die Beobachtung des Agglutinationstypus beim unbehandelten Serum zeigt, daß sich die Bakterien deutlich in zwei Gruppen sondern lassen. Die echten Paratyphus B-Bazillen werden grob und fein ausgeflockt, die Breslaubakterien nur fein.

Der Ausfällungsversuch liefert eine Bestätigung der direkten Beobachtung über den Typus der Agglutination. Sowohl die erhitzten Bakterien beider Gruppen wie die unerhitzten Breslaubakterien entfernen sämtliche Agglutinine für die Breslaustämme, während die Paratyphus B-Stämme noch grob agglutiniert werden.

Versuch XVI.

Ausfällungsversuch mit Paratyphus B-Patientenseris (Typ I).

1. Ausfällung mit Breslaustamm „Makrele".

2. Ausfällung mit erhitzten echten Paratyphus B-Bazillen (Stamm 865).

Zweimalige Ausfällung. Erhitzung der Bakterien 30 Minuten auf 100°.

Bakterienstamm	Patientenserum 2635			Patientenserum 2376		
	unbehandelt	ausgefällt mit		unbehandelt	ausgefällt mit	
		Breslau frisch	Para B 100°		Breslau frisch	Para B 100°
I. Echter Paratyphus B						
865	g + f	g	g	f	—	—
1419	g + f	g	g	g + f	g	g
2458	g + f	g	g	g + f	g	g
2589	g + f	g	g	g + f	g	g
II. Breslaugruppe						
Düsseldorf	f	—	—	f	—	—
Makrele	f	—	—	f	—	—
Breslau IV	f	—	—	f	—	—
Breslau V	f	—	—	f	—	—
Aertryck	f	—	—	f	—	—

Aus der Reihe heraus fällt der echte Paratyphus B-Stamm 865, der durch das eine der beiden Patientensera (2376) nur fein agglutiniert wird. Daß aber auch er thermolabile Rezeptoren besitzt, geht aus seinem Verhalten gegenüber dem anderen Serum hervor.

Der folgende Versuch zeigt 2 weitere Sera, bei denen die Verhältnisse anders liegen.

Versuch XVII.

Ausfällungsversuch mit Paratyphus B-Patientenseris (Typ II).

Bakterienstamm	Patientenserum 2585			Patientenserum 2661		
	unbehandelt	ausgefällt mit		unbehandelt	ausgefällt mit	
		Breslau frisch	Para B 100°		Breslau frisch	Para B 100°
I. Echter Paratyphus B						
865	g + f	—	g	g + f	—	g
1419	f	—	—	f	—	—
2458	f	—	—	f	—	—
2589	g + f	—	g	g + f	—	g
II. Breslaugruppe						
Düsseldorf	f	—	—	f	—	—
Makrele	g + f	—	g	g + f	—	g
Breslau IV	g + f	—	g	g + f	—	g
Breslau V	g + f	—	g	g + f	—	g
Aertryck	g + f	—	g	g + f	—	g

Diese Sera enthalten feine und grobe Agglutinine gegen Vertreter beider Bakteriengruppen. Einzelne Stämme in beiden Gruppen werden aber in groben Flocken nicht ausgefällt.

Die Ausfällung mit erhitzten Bakterien bestätigt die Angabe, daß das Serum grobflockende Agglutinine enthält. Die Ausfällung mit frischen Breslaubakterien entfernt nun die grobflockenden Agglutinine aus sämtlichen Seris.

Die Sera enthalten also grobflockende Agglutinine, die nicht wie die des vorigen Versuchs für die eine der beiden Bakteriengruppen spezifisch sind. Sie greifen vielmehr solche labile Rezeptoren an, die den beiden Gruppen gemeinsam sein müssen.

Die Angabe von Weil und Felix über gemeinsame thermolabile Rezeptoren zwischen einem Paratyphus B-Stamm und einem Fleischvergifter der Paratyphusgruppe, die wir schon mit Hilfe von Breslauimmunseris bestätigen konnten, wird also auch durch das Verhalten der beiden Patientensera als richtig erwiesen. Denn die beiden Patientensera enthalten grobflockende Agglutinine gegen gemeinsame Rezeptoren der beiden Gruppen. Es ist klar, daß derartige Sera zur Differenzierung der beiden Bakteriengruppen nicht zu verwerten sind.

Zwei weitere Patientensera, die sich wiederum anders verhalten, sind im folgenden Versuch aufgeführt.

Versuch XVIII.

Ausfällungsversuch mit Paratyphus B-Patientenseris (Typ III).

Bakterienstamm	Patientenserum 2400			Patientenserum 2429		
	unbehandelt	ausgefällt mit		unbehandelt	ausgefällt mit	
		Breslau frisch	Para B 100°		Breslau frisch	Para B 100°
I. Echter Paratyphus B						
865	g + f	—	g	g + f	g	g
1419	g + f	g	g	g + f	g	g
2458	g + f	g	g	g + f	g	g
2589	g + f	g	g	g + f	g	g
II. Breslaugruppe						
Düsseldorf	g + f	—	—	f	—	—
Makrele	g + f	—	g	g + f	—	g
Breslau IV	g + f	—	g	(g) + f	—	(g)
Breslau V	g + f	—	g	g + f	—	g
Aertryck	g + f	—	g	g + f	—	g

Auch diese Sera enthalten grob- und feinflockende Agglutinine gegen beide Gruppen.

Gegenüber der vorigen Gruppe besteht aber ein Unterschied. Denn die Ausfällung mit dem Breslaustamm hat noch Agglutinine für echte Paratyphus B-Bazillen übrig gelassen. Es müssen diese Sera also zweierlei Arten von grobflockenden Agglutininen enthalten, von denen nur das eine mit Breslaustämmen reagiert. Dies Agglutinin wurde, was in der Tabelle nicht besonders angeführt ist, auch durch lebende echte Paratyphus B-Bazillen ausgefällt. Es stimmt also mit dem grobflockenden Agglutinin des vorigen Versuches überein, welches gegen die den beiden Bakteriengruppen gemeinsamen thermolabilen Rezeptoren gerichtet ist.

Das zweite grobflockende Agglutinin ist streng spezifisch für die echten Paratyphus B-Bazillen und wirkungslos für die Breslaustämme. Es entspricht dem labilotropen Agglutinin im Versuch XVI.

Die hier angeführten Versuche zeigen, daß zwar der Paratyphus B-Kranke unter Umständen Agglutinine gegen sämtliche hier untersuchten Rezeptorengruppen hat, daß aber trotzdem die 3 von uns nachgewiesenen Agglutinine durchaus nicht regelmäßig sämtlich im Patientenserum auftreten.

Regelmäßig haben wir bisher nur die feinflockenden Agglutinine angetroffen. Nur in einzelnen Fällen waren sie allein nachweisbar.

Hier handelte es sich um Sera von Kranken, bei denen sich mit Sicherheit nicht hatte nachweisen lassen, ob es sich um eine Typhus- oder Paratyphusinfektion handelte.

In den durch Bakteriennachweis im Blut sichergestellten Paratyphusfällen waren neben den feinflockenden stets auch grobflockende Agglutinine vorhanden [1]). Für das Auftreten der beiden labilotropen Agglutinine, der für beide Bakteriengruppen gemeinsamen und der für Paratyphus B spezifischen, sind drei Möglichkeiten gegeben. Es kann entweder nur das eine der beiden Agglutinine für sich oder aber beide nebeneinander auftreten.

---

1) Es ist nach Analogie zum Typhus (Weil und Felix, Rotky) sehr wohl möglich, daß es auch Paratyphus B-Patientensera von rein feinflockendem Typus gibt.

Die beiden ersten Möglichkeiten entsprechen dem Typus I und II der Patientensera in den Versuchen XVI und XVII, die Vereinigung der beiden Agglutinine fand sich im Versuch XVIII (Typus III). Es kommen also alle drei theoretisch denkbaren Kombinationen vor[1]. (Vgl. Figur p. 516.)

Anhang zu 1 und 2. Beziehungen der Paratyphus B- und Breslaurezeptoren zu den Rezeptoren der Typhus- und Gärtnerbazillen.

Zwischen den Paratyphus B-Bazillen und den Typhus- und Gärtnerbazillen bestehen serologische Beziehungen, die sowohl in einer partiellen Rezeptorengemeinschaft der Bakterien wie in dem Auftreten von Mit- und Nebenagglutininen in den heterologen Immunseris zum Ausdruck kommen können (Weil und Felix).

Es war von Interesse festzustellen, ob diese serologischen Beziehungen bei den echten Paratyphusbazillen andere sind als bei den Breslaustämmen. Zur Prüfung der Frage wurden zunächst Bindungsversuche mit einem monovalenten Breslau-Kaninchenimmunserum angestellt. Dies Serum enthielt Mitagglutinine für Gärtnerbazillen. Im Ausfällungsversuch ergab sich, daß einmalige Vorbehandlung mit einem Breslau- und einem echten Paratyphusstamm sämtliche Agglutinine entfernte, während Vorbehandlung mit einem Gärtnerstamm die Agglutinine für die beiden anderen Stämme nicht wesentlich beeinflußte. Hieraus folgt, daß echte Paratyphus B-Bazillen und Fleischvergifter identische Nebenrezeptoren für Gärtnerbazillen besitzen.

Die gemeinsamen Rezeptoren sind thermostabil; denn der Typus der Agglutination war feinflockig, und weitere Versuche, die hier nicht besonders angeführt sind, zeigten, daß die Agglutinine für Gärtnerbazillen sich auch durch Bindung mit erhitzten Bakterien aus dem Serum herausnehmen lassen.

1) Dies gilt nur für die geprüften Serumverdünnungen. Es ist möglich, daß im stärker konzentrierten Serum auch die hier nicht nachgewiesenen Agglutininquoten auftreten.

Versuch XIX.

Ausfällungsversuch mit Breslauserum.

Auswertung gegen echten Paratyphus, Fleischvergifter Breslau und Gärtner.

a) Serum unbehandelt,
b) „ ausgefällt mit echtem Paratyphus B (865),
c) „ „ „ Breslaustamm Makrele,
d) „ „ „ Gärtner Lampeter.

	Serum unbehandelt	Nach Ausfällung mit		
		echtem Paratyphus B	Breslau	Gärtner
Paratyphus	5 000	—	—	1000
Fleischvergifter	10 000	—	—	1000
Gärtner	500	—	—	100

Versuche mit einem echten Paratyphusimmunserum fielen ganz entsprechend aus und auch die Agglutinine eines Gärtnerimmunserums waren feinflockend und identisch für echten Paratyphus und für Breslau.

Den Titer des Serums für frische und erhitzte Bazillen zeigt der folgende Versuch.

Versuch XX.

Agglutinationstiter eines Gärtnerimmunkaninchenserums für frische und erhitzte Gärtner-, Enteritis Breslau- und echte Paratyphus B-Bazillen.

	frische Bazillen	erhitzte Bazillen
Gärtner	10 000	2000
Breslaustamm Makrele	2 000	500
Paratyphus 3712	2 000	1000

Die „erhitzten“ Bakterien waren 10 Min. auf 100° erhitzt worden.

Die Mitagglutination war typisch feinflockig, was auch in dem Titer für die erhitzten Bakterien zum Ausdruck kommt.

Ausfällung des Serums mit Typhusbazillen (diese haben mit den Gärtnerbazillen nach Weil und Felix nur die feinflockenden Agglutinine gemeinsam, was auch für unsere Versuche zutraf) machte das Serum unwirksam für einen echten Paratyphusstamm und für einen Fleischvergifter, während umgekehrt Ausfällung mit dem Fleischvergifter zwar die Agglutinine für den Fleischvergifter und den echten Paratyphusstamm, nicht aber sämtliche Agglutinine für Typhus entfernte.

Versuch XXI.

Ausfällung eines Gärtnerimmunkaninchenserums mit Typhusbazillen und mit einem Breslaustamm.

Prüfung gegen Typhus, Breslau und echten Paratyphus B.

	Serum		
	unbehandelt	ausgefällt mit	
		Typhus Weil 901	Breslaustamm
Gärtner Krohn	10 000	5000	5000
Typhus Weil 901	5 000	100 ±	100
„Breslau“	2 000	—	—
Paratyphus B 3712	2 000	—	—

Ebenso wurden aus einem Gärtnerpatientenserum durch Vorbehandlung mit erhitzten Typhusbazillen oder mit erhitzten Gärtnerbazillen sämtliche Agglutinine für echte Paratyphus B-Bazillen und für Fleischvergifter entfernt, während noch grobflockige gegen Gärtnerbazillen wirksame Agglutinine im Serum verblieben.

Die Versuche mit Breslau- und Paratyphus B- sowie Gärtnerserum und mit Gärtnerpatientenserum ergaben also regelmäßig, daß die Wirksamkeit auf heterologe Bakterien in der Gemeinsamkeit thermostabiler Rezeptoren begründet war. Die Rezeptoren, die die echten Paratyphus B-Bazillen mit Gärtner und Typhus gemeinsam haben, sind identisch mit den entsprechenden der Breslaustämme.

. Untersuchung der Paratyphusstämme mit Normalagglutininen.

Die Anwendung der Weil-Felixschen Methodik der Agglutininanalyse auf die Agglutinine normaler Sera ließ eine Bestätigung und Ergänzung der bisherigen Feststellungen über die Beziehungen zwischen der Paratyphus B- und der Breslaugruppe erwarten.

Zu den Versuchen wurde zunächst normales Rinderserum verwandt. Das Serum agglutinierte 2 echte Paratyphus B-Stämme und 3 Fleischvergifter in 10 facher Verdünnung bei Ablesung mit der Lupe bereits nach 10 Minuten deutlich, und zwar in feinen Flocken.

Bei längerer Beobachtungsdauer wurden auch erhitzte Bakterien agglutiniert. Die Titerwerte ergeben sich aus der folgenden Uebersicht:

Versuch XXII.

Agglutination frischer und erhitzter Bakterien der Paratyphusgruppe durch normales Rinderserum.

Bakterienstamm	865	1970	Makrele	Breslau	Aertryck
lebende Bakterien	200	200	100	200	200
erhitzte Bakterien	200	100	200	200	500
	echte Paratyphus-bazillen		Breslaubazillen Ablesung nach 20 Stunden		

Inaktivierung des Serums 15 Min. bei 56°.

Normalagglutinine waren also in dem Serum in annähernd gleichem Maße für alle 5 Stämme vorhanden.

Da die Agglutination rein feinflockig war, so war von den Normalseris im Gegensatz zu den früher untersuchten Immunseris nicht zu erwarten, daß sie eine Differenzierung der Breslaustämme von den echten Paratyphus B-Bazillen erlauben würde.

Denn die thermostabilen Rezeptoren dieser beiden Gruppen sind ja identisch, und da die Agglutination feinflockig war, so konnten nur sie es ein, die mit dem Normalserum reagierten. Bindungsversuche bestätigten diese Annahme.

Versuch XXIII.

Normales Rinderserum. Bindungsversuch mit erhitztem Breslau.

Serumverdünnung 1:20, 5,0 ccm zweimal ausgefällt mit je einer Plattenkultur (wie oben Versuch III):

a) Serum unbehandelt,

b) Serum zweimal ausgefällt mit erhitztem Breslau (Stamm Makrele, 30 Minuten 100°).

Bakterien	Serum	
	unbehandelt	ausgefällt mit Breslau 100°
Paratyphus B		
865	+++ fein	—
1419	++ „	—
1470	+++ „	—
Breslau		
Makrele	+ fein	—
Breslau	++ „	—
Aertryck	+++ „	—

Die Vorbehandlung mit erhitzten Bazillen hat also das Serum in gleicher Weise für sämtliche Stämme unwirksam gemacht.

Der Versuch bestätigt aufs neue die Annahme von der Identität der thermostabilen Rezeptoren bei beiden Bakteriengruppen.

Das Verhalten des Normalserums ist nun noch von einem besonderen Gesichtspunkte aus bemerkenswert. Das Serum ist das erste unter den bisher besprochenen, das lediglich feinflockende Agglutinine für die Paratyphusbazillen enthält. Das isolierte Auftreten der feinen Agglutinine bedeutet keinen prinzipiellen Unterschied gegenüber den Immunseris, denn durch Vorbehandlung mit erhitzten Bazillen haben Weil und Felix auch in der Paratyphusgruppe rein feinflockende Antisera erzeugen können.

Auffallend und bemerkenswert aber ist es, daß es uns bisher auch sonst niemals gelang, in normalen Seris, und zwar bei verschiedenen Tierspezies, grobflockende Agglutinine nachzuweisen.

Untersucht wurde außer Rinderserum noch Serum von Mensch, Kaninchen, Schwein, Hammel, Meerschweinchen und Pferd.

Neben den in Versuch XVIII aufgeführten Stämmen der Paratyphusgrnppe wurden noch einige andere Bakterienarten in die Untersuchung einbezogen, nämlich der Weil-Felixsche Bazillus X 19 in seiner O- und H-Form, der Bazillus X 2 (H-Form) und der Bacillus pyocyaneus Z 1 von Kreuscher. Diese Stämme wurden gewählt, weil gegen sie (mit Ausnahme des Pyocyaneus und des OX 19) bei Immunisierung regelmäßig auch grobflockige Agglutinine gebildet werden.

Das Meerschweinchenserum agglutinierte in 5- und 10-facher Verdünnung die geprüften Bakterien nicht.

Die Sera von Hammel, Schwein, Mensch, Pferd und Kaninchen fällten ebenso wie Rinderserum die Bakterien in feinen Flocken aus, soweit sie überhaupt wirksam waren.

Die Sera waren auch gegen erhitzte Bakterien wirksam, und die Agglutinine wurden durch die erhitzten Bakterien spezifisch gebunden.

Bei einzelnen Normalseris von Mensch, Hammel und Rind traten schon nach 15 Minuten größere Flocken auf, so daß zunächst an die Anwesenheit grobflockender Agglutinine gedacht wurde. Auch hier zeigten aber Bindungsversuche, daß ausschließlich stabilotrope Antikörper vorhanden waren.

Wie bekannt, ist in ganz ähnlicher Weise gelegentlich auch bei sehr kräftig wirkenden Seris von Fleckfieberkranken die Erkennung des Typus in den stärkeren Serumkonzentrationen erschwert.

Die Agglutinine der untersuchten Normalsera entsprechen also dem feinflockenden Typus von Weil und Felix sowohl nach dem Aussehen der Flocken wie hinsichtlich der Ausfällbarkeit durch erhitztes Antigen.

Es wird in weiteren Untersuchungen festzustellen sein, ob es überhaupt Normalsera gibt, die labilotrope grobflockende Agglutinine enthalten [1]).

Das Fehlen der labilotropen Agglutinine, zumindest in manchen Normalseris, ist von grundsätzlicher Bedeutung für die Frage, wieweit die Immunkörper von den normalen Antikörpern qualitativ verschieden sind.

Für den Spezialfall der Agglutinine würde nunmehr die Frage je nach dem Typus der Agglutinine verschieden zu beantworten sein: Die feinflockenden stimmen qualitativ mit denen des Normalserums überein; die grobflockenden dagegen stellen sich dar als echte Immunkörper, deren Existenz im Normalserum bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte.

Interessant ist es nun, daß ähnliche Verhältnisse auch bei einer anderen Antikörpergruppe, nämlich den Schafbluthämolysinen, bestehen. Die Schafbluthämolysine des normalen Kaninchens werden nach den Feststellungen von Forssman [2]) und von Friedemann [3]) von erhitzten Hammelblutkörperchen gebunden. Sie sind also stabilotrop, genau wie die bisher untersuchten Bakterienagglutinine der Normalsera.

Die Immunhämolysine gegen Schafblut hingegen sind ebenso wie die Immunagglutinine gegen die Bakterien der Typhus-, Paratyphus- und der Proteusgruppe zum Teil stabilotrop, zum Teil labilotrop.

Der Parallelismus läßt sich noch erweitern. Das thermostabile Antigen der Schafblutkörperchen ist ebenso wie das thermostabile der Bakterien widerstandsfähig gegen Alkohol

---

1) Rotky (Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig., Bd. 87, p. 16) bemerkt, daß die normalen Agglutinine des Menschen gegen Typhus „wohl in den allermeisten Fällen zu den kleinflockenden Agglutininen gehören".

2) Forssman, Biochem. Zeitschr., Bd. 37, No. 11.

3) Friedemann, Biochem. Zeitschr., Bd. 80. Vgl. auch Nakano. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 76.

Sachs und Guth, Sordelli und Pico, Weil und Felix[1]. Die heterogenetischen Antikörper gehören also einem weitverbreiteten Typus von Antikörpern an, einem Typus, der unter den Bakterienagglutininen häufig ist und der anscheinend den Haupttypus, wenn nicht den einzigen Typus der Bakterienagglutinine normaler Sera darstellt.

Die Eigentümlichkeit der Normalagglutinine könnte vielleicht auch eine gewisse praktisch-diagnostische Bedeutung gewinnen.

Die klinische Verwertung der Widalschen Reaktion wird bei Entnahme des Blutes in einem frühen oder sehr späten Krankheitsstadium oft dadurch eingeschränkt, daß ein Titer gefunden wird, der sich innerhalb der als normal geltenden Schwankungsbreite hält. In derartigen Fällen wird nach unseren Feststellungen eine, wenn auch schwache Agglutination dann als spezifisch anzusehen sein, wenn sich die im normalen Serum fehlenden groben Agglutinine nachweisen lassen.

Das subjektive Moment in der Bewertung der Agglutinationstypen läßt sich dadurch ausschalten, daß das Serum bis zur Erschöpfung seines Gehaltes an feinflockenden Agglutininen mit erhitzten Bakterien ausgefällt wird.

Das ausgefällte Serum setzt man einerseits mit frischen, andererseits mit erhitzten Bakterien zur Agglutination an. Tritt jetzt bei den ersteren eine Agglutination auf, bei den letzteren dagegen nicht, so enthält das Serum labilotrope „grobflockende“ Immunantikörper.

Ob solche für die Immunisierung spezifischen Antikörper im klinischen Sinne spezifisch sind, oder ob auch bei unspezifischen Steigerungen, z. B. nach Art der anamnestischen Reaktion, grobflockende Agglutinine auftreten können, darüber besitzen wir noch keine Erfahrung.

Die vorstehenden Untersuchungen bestätigen vom serologischen Standpunkt aus die Angaben der Kieler Schule über das differente Verhalten der echten Paratyphus B-Bazillen und der Fleischvergifter der Breslaugruppe. Mit Hilfe der

1) Das heterogenetische Antigen gilt als alkohollöslich, das thermostabile Bakterienantigen verträgt nach Weil Einwirkung von Alkohol. In alkoholischen Auszügen ist es nach den bisherigen allerdings noch nicht abgeschlossenen Untersuchungen von Weil nur wirksam, soweit diese Auszüge noch „Bakterientrümmer“ enthalten, nicht mehr aber nach keimfreier Filtration der Auszüge (Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 29).

Rezeptorenanalyse nach Weil und Felix war es möglich, einen genaueren Einblick in den Bau der Rezeptorenapparate zu gewinnen als bisher.

Die ablehnende Stellung einzelner Kliniker gegenüber der Zusammenfassung aller durch Bakterien der Paratyphus B-Gruppe hervorgerufenen Erkrankungen zu einer klinischen Einheit „Paratyphus“ findet nun ihre Rechtfertigung. Auf der anderen Seite wird es aber auch verständlich, warum sich bisher, d. h. ohne Berücksichtigung der beiden Agglutinintypen, eine serologische Differenzierung der Bakterien des Typus Breslau von den echten Paratyphus B-Bazillen nicht befriedigend durchführen ließ, obwohl die beiden Gruppen unzweifelhaft serologisch verschieden sind.

Wenn der Doppeltypus der Rezeptoren nicht berücksichtigt wird, so müssen in der Tat Agglutinations- und Bindungsversuche ganz regellos ausfallen. Entscheidend für den Ausfall wird dabei in erster Linie das Verhältnis des grobflockigen Titers zum feinflockigen sein. Ueberall dort, wo die nicht streng spezifischen feinflockenden Agglutinine überwiegen, können Unterschiede nicht erkannt werden. So waren Uhlenhuth und seine Mitarbeiter nach dem Ausfall ihrer umfassenden Versuche seinerzeit im Recht, wenn sie die Enteritisbakterien, soweit sie nicht zur Gärtnergruppe gehören, einfach der Paratyphus B-Gruppe einordneten, und ihnen eine serologische Sonderstellung nicht zuschreiben wollten [1]).

1) Zusatz bei der Korrektur: Auch die schwankenden Befunde von Manteufel und Beger (siehe oben) erklären sich bei Berücksichtigung des Agglutinintypus jetzt zwanglos. Die Eselimmunsera, die im Castellanischen Versuch eine Differenzierung erlaubten, enthielten zweifellos reichlich die spezifischen grobflockenden Agglutinine; die anderen untersuchten Sera dagegen nicht. Die spezifischen Rezeptoren der Breslaugruppe entzogen sich bei diesen Versuchen überhaupt dem Nachweis.

Die Untersuchungen lassen sich mit denen von Trommsdorff und Rajchmann (Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 9) vergleichen, wo ebenfalls nur einzelne Sera die Differenzierung von Bakterien einer Fleischvergiftung gegenüber den echten Paratyphusbazillen erlaubten, so daß es im Endergebnis unklar blieb, ob nun die differenzierenden oder die nicht differenzierenden Sera für die Diagnose entscheidend sein sollten.

Alle diese Versuche zeigen, daß es ohne Berücksichtigung des Agglutinationstypus nicht gelingt, über die Beziehung der beiden Bakteriengruppen zueinander Klarheit zu gewinnen.

Auch die früher festgestellte Unmöglichkeit, die beiden Gruppen mit Hilfe der Komplementbindung zu unterscheiden, steht mit der jetzt gewonnenen Feststellung, daß serologische Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bestehen, nicht im Widerspruch, denn Weil und Felix haben nachgewiesen, daß die Komplementbindungsreaktion lediglich an die thermostabilen Rezeptoren geknüpft ist, und gerade diese sind beiden Gruppen gemeinsam [1]).

Es muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß nicht mit ganz scharfen Unterschieden in jedem Einzelfall zu rechnen ist. Das wäre sowohl aus klinischen Gründen, wie mit Rücksicht auf die bekannte Variabilität in der Paratyphusgruppe unwahrscheinlich.

Es sei daran erinnert, daß die klinische Abgrenzung der typhösen von der gastroenteritischen Form nicht immer scharf durchführbar ist. Es gibt bei Fleischvergiftungen einzelne Fälle, die protrahiert verlaufen und wenigstens nach dem Fieberverlauf der typhösen Form entsprechen. Auf Einzelheiten aus der großen klinischen Literatur kann hier nicht eingegangen werden. Es sei nur aus der neuesten Zeit eine Beobachtung von Reichenbach erwähnt, wonach 9 Personen nach dem Genuß von Fischsülze zunächst „unter gastrointestinalen Symptomen erkrankten, woran sich dann aber einige Tage später die eigentliche Typhuserkrankung anschloß“.

Immerhin ist es wahrscheinlich, daß die für den Paratyphus B sichergestellten Darmgeschwüre mit den Merkmalen der typhösen Ulcera, ebenso wie die Paratyphusroseola, die nach E. Fränkel pathologisch-anatomisch von der Typhusroseola nicht zu unterscheiden ist, lediglich bei Infektion mit echten Paratyphus B-Bazillen auftreten. Wenigstens sind mir entsprechende pathologisch-anatomische Befunde für Fleischvergiftungen nicht bekannt. Ob ferner auch Erkrankungen, die epidemiologisch in den Kreis der typhösen Erkrankungen gehören, als reine akute Gastroenteritis verlaufen können, scheint mir aus der vorliegenden klinischen Literatur nicht mit Sicherheit hervorzugehen.

Ich selbst habe, ähnlich wie Bitter, echte Paratyphus B-Epidemien gesehen, bei denen neben typisch typhösen zwar leichte, dem Fieberverlauf nach atypische Formen, nicht aber typische Gastroenteritisfälle auftraten.

Die Untersuchungen über die Variabilität in der Typhus-Paratyphus-

1) Die seit langem bekannten Wechselbeziehungen zwischen Typhus- und Gärtnerbazillen im Pfeifferschen Versuch, die wir erneut bestätigen konnten, weisen darauf hin, daß auch die bakteriolytischen Antikörper mit den thermostabilen Rezeptoren reagieren; so sahen wir beispielsweise, daß ein Typhuspatientenserum Meerschweinchen nicht nur gegen eine Infektion mit Typhus-, sondern auch mit Gärtnerbazillen schützt. Ueber das Verhalten der thermolabilen Rezeptoren in dieser Hinsicht sind unsere Untersuchungen noch nicht abgeschlossen.

gruppe (Sobernheim und Seligmann, Bernhardt, Bärthlein, K. F. E. Schmitz u. a.) weisen ebenfalls darauf hin, daß mit dem Vorkommen von Uebergängen gerechnet werden muß. Soweit sich die bisherigen Angaben auf das serologische Verhalten beziehen, bedürfen sie einer Ergänzung durch neue Untersuchungen, die den Typus der Agglutination berücksichtigen. Jedenfalls zeigen schon die vorliegenden Beobachtungen, daß auch bei ein und demselben Stamm der Rezeptorenapparat erheblichen Aenderungen unterworfen sein kann.

Auch die Aenderungen, die im biochemischen Verhalten bei einzelnen Stämmen nach längerer Beobachtungsdauer auftreten können, zeigen, daß es abwegig wäre, eine starre Klassifizierung unter der Annahme einer völligen Konstanz sämtlicher Merkmale zu versuchen.

Diese Bedenken lassen sich aber schließlich auch anführen gegen eine scharfe Abgrenzung der Typhus- von den Gärtnerbazillen. Ernstlich wird niemand daran denken, diesen Unterschied fallen zu lassen. Genau so möchte ich den serologischen Unterschied zwischen den echten Paratyphus B-Bazillen und den Fleischvergiftern der Paratyphusgruppe aufrecht erhalten. Denn das Verhalten des Bacillus enteritidis Breslau zum echten Paratyphusbazillus ist ein ganz ähnliches wie das des Gärtner- zum Typhusbazillus. Beide Male steht neben dem Erreger der typhoiden Verlaufsform eine Gruppe von Fleischvergiftern, die sich von jenen durch thermolabile Rezeptoren unterscheidet. In der Paratyphus B-Gruppe ist im Gegensatz zur Typhus-Gärtnergruppe die Differenzierung noch dadurch erschwert, daß in der Regel auch gemeinsame thermolabile Rezeptoren vorhanden sind, was in der Typhus-Gärtnergruppe nur ausnahmsweise der Fall ist.

Zusammenfassung.

1) Zwischen den echten Paratyphus B-Bazillen und den Fleischvergiftern der Paratyphusgruppe vom Typus Breslau bestehen regelmäßig serologische Unterschiede.

Die Unterschiede sind nachweisbar bei Zuhilfenahme von Immunseris mittels der Rezeptorenanalyse nach Weil und Felix. Hierbei erhält man über den Rezeptorenapparat der beiden Bakteriengruppen folgenden Aufschluß:

a) Beide Gruppen besitzen thermostabile und thermolabile Rezeptoren.

b) Die thermostabilen Rezeptoren beider Gruppen sind identisch. Die thermolabilen sind teilweise verschieden: es

gibt solche, die beiden Gruppen gemeinsam, daneben aber andere, die für jede Gruppe spezifisch sind.

2) Die monovalenten Immunsera enthalten, entsprechend den Rezeptoren, „grob“- und „feinflockende“ Agglutinine im Sinne von Weil und Feiix, die nach ihrer Beziehung zu den thermolabilen und thermostabilen Rezeptoren hier auch als „labilotrop“ und „stabilotrop“ bezeichnet werden.

Durch Beobachtung des Agglutinationstypus und in Ausfällungsversuchen lassen sich nachweisen:

a) stabilotrope Agglutinine, welche gegen die den Paratyphus B- und Breslaubazillen gemeinsamen thermostabilen Rezeptoren gerichtet sind;

b) labilotrope Agglutinine, die in gleicher Weise unspezifisch sind;

c) für Paratyphus B spezifische labilotrope Agglutinine;

d) für Breslau spezifische labilotrope Agglutinine.

Die monovalenten Immunsera können jeweils die drei Agglutinine (a, b und c bzw. a, b und d) enthalten. Es kann aber auch b oder c fehlen („Unvollständigkeit der Immunsera“).

3) Paratyphus B-Patientensera können neben feinflockenden Agglutininen grobflockende enthalten. Die grobflockenden Agglutinine des Paratyphus B-Kranken sind entweder nur gegen einen Teil der thermolabilen Rezeptoren, nämlich gegen den beiden Gruppen gemeinsamen Anteil oder nur gegen den differenten Teil, oder aber gegen beide gleichzeitig gerichtet. Die ersteren entsprechen den unter 2a) aufgeführten Agglutininen, die anderen den unter 2b) und 2c) genannten.

4) Die Agglutinine der untersuchten Normalsera von Mensch, Pferd, Rind, Schwein, Hammel, Kaninchen, Meerschweinchen gehören dem feinflockenden Typus an und sind durch erhitzte Bakterien ausfällbar, also stabilotrop.

Der Nachweis grobflockender gegen die labilen Bakterienrezeptoren gerichteter Agglutinine im Normalserum gelang bisher nicht.

Es besteht hier eine Analogie zu dem Verhalten der von Forssman und Friedemann untersuchten Schafblut-Hämolysine in Normalseris, die ebenfalls stabilotrop sind.

[Aus dem Hygienischen Institut der Akademie für praktische Medizin zu Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. Bürgers).]

Serologische Studien mit Hilfe des Zeißschen Flüssigkeitsinterferometers.

I. Mitteilung.

Von Dr. **W. Bachmann,**
1. Assistent des Instituts.

Mit 2 Abbildungen im Text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 21. Oktober 1921.)

Die rastlose Arbeit der letzten Jahrzehnte der Immunitätsforschung hat, namentlich befruchtet von den Ehrlichschen Immunitätsvorstellungen, zu großen Erfolgen auf praktischem wie auf erkenntnistheoretischem Gebiet geführt, ohne daß es jedoch gelungen wäre, die bei diesen Immunitätsvorgängen zusammentretenden Komponenten in ihrem Wesen sicher zu erkennen oder über die Art ihres Zusammenwirkens exakte Vorstellungen zu gewinnen. Der Grund dafür ist darin zu suchen, daß es bisher nicht möglich gewesen ist, die Struktur der Eiweißkörper, Lipoide usw., die bei den Immunitätsreaktionen eine so große Rolle spielen, aufzuklären. Auch die physikalisch-chemischen Erscheinungen, die neuerdings hierbei immer mehr in den Vordergrund gerückt werden, sind noch nicht genügend erforscht, um sie in völlig befriedigender Weise zur Klärung der Immunitätsvorgänge verwerten zu können. Und noch eine dritte Unbekannte kommt hinzu: das ist die Spezifität dieser Reaktionen, die rein chemisch-physikalisch zu deuten wohl kaum gelingen wird, auch wenn unsere Kenntnisse in der Eiweiß- und Kolloidchemie weiter fortgeschritten sein werden als heute. So kommt es, daß wir mit unseren zurzeit üblichen Immunitätsvorstellungen mehr oder weniger auf einem toten Punkt angekommen sind. Fast alle Arbeiten, die auf diesem Gebiet erscheinen, bewegen

sich in den erprobten Bahnen, wie sie Ehrlichs Scharfsinn ersonnen hat. Jede wirklich neue Idee, mag sie noch so sehr auf Widerspruch stoßen, muß darum begrüßt werden, weil sie berufen sein kann, ein Dogma zu erweitern, das von vielen nur noch rein schematisch verstanden wird. Es ist das Verdienst Abderhaldens (1), mit seiner Lehre von den Abwehrfermenten das Problem der parenteralen Verdauung von körperfremden Stoffen verständlich gemacht zu haben, eine Lehre, die zu seiner so vielfach angefeindeten Schwangerschaftsdiagnose geführt hat. Daß die Praxis sich diesem Verfahren gegenüber ablehnend verhält, ist wegen der großen technischen Schwierigkeit der Reaktion und auch aus anderen Gründen vollkommen verständlich, besagt aber nichts gegen die Richtigkeit der Abderhaldenschen Gedankengänge. Es liegt nun nahe, solche Abwehrfermente, wie sie Abderhalden für Eiweißkörper (2), Kohlehydrate (3, 4) und Fette (5) bei parenteraler Zufuhr dieser Stoffe nachgewiesen hat, auch bei den spezifischen Immunitätsreaktionen vorauszusetzen, da es sich ja auch hier darum handelt, körperfremde Stoffe unschädlich zu machen, die ihrer Natur nach sicher zu den Eiweißkörpern, Kohlehydraten, Fetten usw. gehören, beziehentlich aus ihnen allen oder einem Teil derselben zusammengesetzt sind. So hat Calcar (6) für die spezifische Niederschlagsbildung, wie sie z. B. bei der Präzipitation und Agglutination auftritt, folgende Theorie aufgestellt: „Beim Präzipitationsvorgang in einem Gemisch von Normalserum und Antiserum entstehen sauer reagierende Eiweißspaltprodukte, die aus den Albuminen des Antigens stammen. Die hierdurch entstehende Aenderung der Reaktion des Gemisches läßt die Globuline als sichtbares Präzipitat ausfallen.“ Das Präzipitin ist also nach Calcar ein den Abwehrfermenten nahestehender, vielleicht mit ihnen identischer Körper, der beim normalen Tier nicht oder nur in geringen Mengen vorhanden ist. Als Eiweißspaltprodukte hat Calcar die leicht darstellbare Glutaminsäure isoliert. Jedoch sind die Versuche, auf denen seine Annahme begründet ist, nicht zweifellos richtig, da bei seiner Versuchsanordnung die Abspaltung der Glutaminsäure auch erst sekundär durch die verwendete Salzsäure erfolgt sein kann. Daß die Wirkung des Präzipitins bei den Albuminen

des Serums angreift, wird durch die Beobachtungen von Umber (7), Chittenden und Hartwell (8), E. Fischer und Abderhalden (9), Oppenheimer und Aron (10) gestützt, wonach das native nicht denaturierte, im Serum in Lösung befindliche Serumglobulin im Vergleich zu anderen Proteinen große Resistenz gegen Fermente besitzt. Auch die Untersuchungen von Chick und Martin (11) sprechen für die Richtigkeit der Calcarschen Auffassung; die günstigste Azidität für Präzipitationen bei Abwesenheit von Elektrolyten liegt nämlich bei einer Wasserstoffzahl von $3 \cdot 10^{-6}$. Für genuines Serumglobulin liegt nun der isoelektrische Punkt ebenfalls bei $3 \cdot 10^{-6}$, während er für Albumin bei $2 \cdot 10^{-5}$ liegt. Daraus geht hervor, daß das Flockungsoptimum des spezifischen Präzipitats mit demjenigen des Serumglobulins zusammenfällt. Dies stützt die in obiger Fassung der Theorie von Calcar enthaltene Annahme der Identität von spezifischem Präzipitat und Serumglobulin. Paul Hirsch hat nun, von demselben Gedanken ausgehend, auf einem anderen Wege versucht, in das Wesen der spezifischen Flockungserscheinungen einzudringen. Er nimmt an, daß bei den spezifischen Immunitätsvorgängen ein Abbau des artfremden Eiweißes (Antigen) bis zu den Peptonen stattfindet, wodurch eine Konzentrationsänderung in dem Gemisch Antigen + Antiserum erfolgt, die er auf optischem Wege, und zwar mit Hilfe des Zeißschen Flüssigkeitsinterferometers messend, verfolgt. Der Gedanke ist an sich nicht neu, da bereits Obermayer und Pick (12) mit Erfolg versucht haben, mit dem Pulfrich-Refraktometer die Menge Eiweiß zu bestimmen, die Normalserum aus einem Immunserum auszufällen vermag. Es wird bei ihrer Versuchsanordnung der Brechungsexponent eines Serum-Antiserumgemisches vor und nach der Präzipitation gemessen und aus der festgestellten Abnahme des Brechungsexponenten auf die Menge des in das Präzipitat übergegangenen Eiweißes geschlossen. Der von ihnen gefundene Wert beträgt nur 0,000162, woraus zu sehen ist, daß die in das Präzipitat übergegangene Eiweißmenge sehr gering sein muß. Sie nehmen an, daß die Abnahme des Brechungsindex einen Anhalt geben kann für die Größe des Präzipitats. Die interferometrische Methode, wie sie Hirsch und seine Mitarbeiter benutzen.

hat nun den großen Vorteil, daß sie es gestattet, bedeutend geringere Konzentrationsunterschiede zu messen, als das mit dem Pulfrich-Refraktometer möglich ist. In seinen mit Hilfe des Interferometers angestellten immunochemischen Untersuchungen zeigt Hirsch, daß in einem Gemisch von Antirizinserum und Rizinlösung der Interferometerwert vor der Präzipitation höher ist, als nach erfolgter Niederschlagsbildung. Es ist also eine Konzentrationsverringerung in dem Gemich Rizin-Antirizinserum eingetreten. Woher stammt nun der Niederschlag? Hirsch sucht diese Fragestellung dadurch zu lösen, daß er den in dem Gemisch gefundenen Interferometerwert zerlegt in den Anteil, den die einzelnen Komponenten des Gemisches aufweisen, also den Interferometerwert der zur Verdünnung dienenden physiologischen Kochsalzlösung, den Anteil der Nichteiweißbestandteile des Antirizins, der Eiweißkörper des Antirizins, des Rizins und desjenigen des Präzipitats. Es ergibt sich da die auffallende Tatsache, daß der Interferometerwert für den Anteil des Rizins und für das Präzipitat fast völlig übereinstimmen. Hirsch neigt deshalb zu der Ansicht, daß der Immunkörper (Antirizinserum) tatsächlich das homologe Eiweiß ausflockt (Rizin). In einer zweiten Arbeit (18) untersucht er mit der gleichen Methode die Wirkung von Typhusimmunserum auf Fickersches Diagnostikum. Auch hier tritt nach der Ausflockung eine Konzentrationsänderung in dem Gemisch Immunserum + Typhusbazillenextrakt ein, und zwar zuerst eine Konzentrationsverminderung, während nach 24-stündigem Stehen eine Konzentrationsvermehrung nachzuweisen ist, die Hirsch als einen Eiweißabbau des Antigens durch Abwehrfermente auffaßt. Weiterhin beschäftigt sich einer seiner Mitarbeiter, Langenstraß (19) in gleicher Versuchsanordnung mit der Interferometrie präzipitierender Sera. Seine Versuchsergebnisse sind nicht eindeutig, da er in dem Gemisch Serum-Antiserum in seinen 4 Hauptversuchen zweimal eine Abnahme der Konzentration nach der Ausflockung, einmal jedoch eine Zunahme beobachtet, während bei dem vierten Versuch eine Aenderung der Konzentration nicht festzustellen ist. Die Langenstraßschen Messungen haben aber vor den Hirschschen Befunden den großen Vorzug,

daß alle Werte experimentell beobachtet sind, während Hirsch den Wert für Immunserum + Antigen vor der Ausflockung stets berechnet hat. Ich komme auf diesen Punkt bei meinen eigenen Versuchen noch zurück. Der Vollständigkeit halber möchte ich noch anführen, daß Hirsch (20, 21) die Abderhaldensche Abwehrfermentmethode durch interferometrische Messung des im Gemisch Serum + Substrat erfolgenden Abbaues ersetzt hat. Ebenso hat einer seiner Mitarbeiter (22) die interferometrische Methode dazu verwendet, um im Serum tuberkulöser Rinder Abwehrfermente gegen entsprechende Organe nachzuweisen, allerdings nicht mit dem praktischen Ergebnis, um diese Methode für diagnostische Zwecke brauchbar erscheinen zu lassen. Jedenfalls geht aus dieser kurzen literarischen Uebersicht hervor, daß es lohnend erscheint, manche Fragen der Immunitätslehre mit dieser so überaus feinen Methode messend zu verfolgen.

Meine eigenen Versuche mit Hilfe des Zeißschen Flüssigkeits-Interferometers erstrecken sich nun einmal auf spezifische Flockungserscheinungen, wobei ich mich auf die Agglutination und die Flockungsreaktion nach Sachs-Georgi beschränkt habe; weiterhin beschäftigen sie sich mit der Komplementbindung zwischen Antigen und spezifischem Serum, wobei ich besonderen Wert auf die Untersuchung der ersten Phase der Wassermannschen Reaktion gelegt habe. Da ich annehmen möchte, daß das Prinzip der interferometrischen Untersuchung von Flüssigkeiten einem Teil der Leser nicht geläufig ist, so beginne ich mit einer Beschreibung des Zeißschen Flüssigkeitsinterferometers, wie sie Hirsch in seinen Fermentstudien gibt; die beigegebenen Abbildungen 1 und 2 machen den Text erst völlig verständlich.

„Der Beleuchtungsapparat *B*, bestehend aus einem Osmiumlämpchen und einem Linsensystem, ist in einem kleinen Tubus neben dem Fernrohr untergebracht. Der Faden des Lämpchens wird quer auf einem Spalt abgebildet. Der aus diesem Spalt heraustretende Lichtstrahl fällt auf den am hinteren Ende des Apparates angeordneten, mit Justiereinrichtungen reichlich ausgestatteten Spiegel *S*. In oder dicht an dieser Spiegelebene liegen 2 Doppelblenden, welche die Beugungserschei-

nungen hervorrufen. Der nahezu senkrecht auffallende Lichtstrahl wird vom Spiegel zurückgeworfen und durch das Objektiv des Fernrohrs zu einem Interferenzbild vereinigt. Das Interferenzbild liegt dabei dicht neben dem sehr fein einstellbaren Spalt und wird mittels des Okulars *Ok*, das aus einer Zylinderlinse besteht, betrachtet.

Durch das Zylinderokular wird der durch starke Vergrößerung verursachte Uebelstand der geringen Helligkeit des Bildes überwunden. Ein Zylinderokular vergrößert nur in der Richtung senkrecht zu seiner Achse, wirkt aber in Ebenen, die durch die Achse gehen, wie ein Fenster. Die Licht-

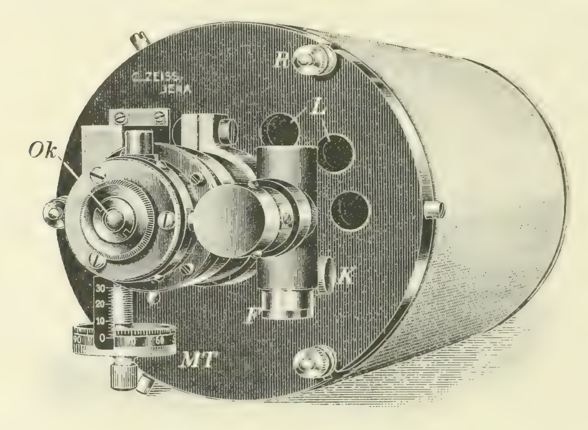


Fig. 1. Ansicht des „Kopfes“ des Flüssigkeitsinterferometers. (*FK* = Beleuchtungsapparat, *Ok* = Okular, *MT* = Meßtrommel.)

strahlen der parallelen Strahlenbüschel müssen auf ihrem Wege zum und vom Spiegel S durch die Platten P_1 und P_2 des Kompensators K, ferner durch die planparallelen Platten eines Temperierbades Tr, durch die Temperierflüssigkeit selbst und durch die in das Temperierbad von oben eingehängten mit 2 planparallelen Glasplatten versehenen und mit der zu untersuchenden bzw. zu vergleichenden Flüssigkeit gefüllten Flüssigkeitskammern hindurchtreten. Nur die obere Hälfte der Lichtstrahlen nimmt diesen Weg; die untere Hälfte des planparallelen Strahlenbüschels geht unter der Flüssigkeitskammer her und erzeugt in dem Okular das unveränderliche, als Nullage dienende Interferenzspektrum. Dieses besteht aus

einem weißen Feld, dem sogenannten Maximum nullter Ordnung und symmetrisch dazu angeordneten Beugungserscheinungen, Beugungsspektren, welche durch sehr schmale schwarze Minimastreifen getrennt sind.

Befinden sich in den beiden Hälften der Doppelkammern Flüssigkeiten von genau gleicher Lichtbrechung, mit anderen Worten Flüssigkeiten von gleicher Konzentration, so erzeugt

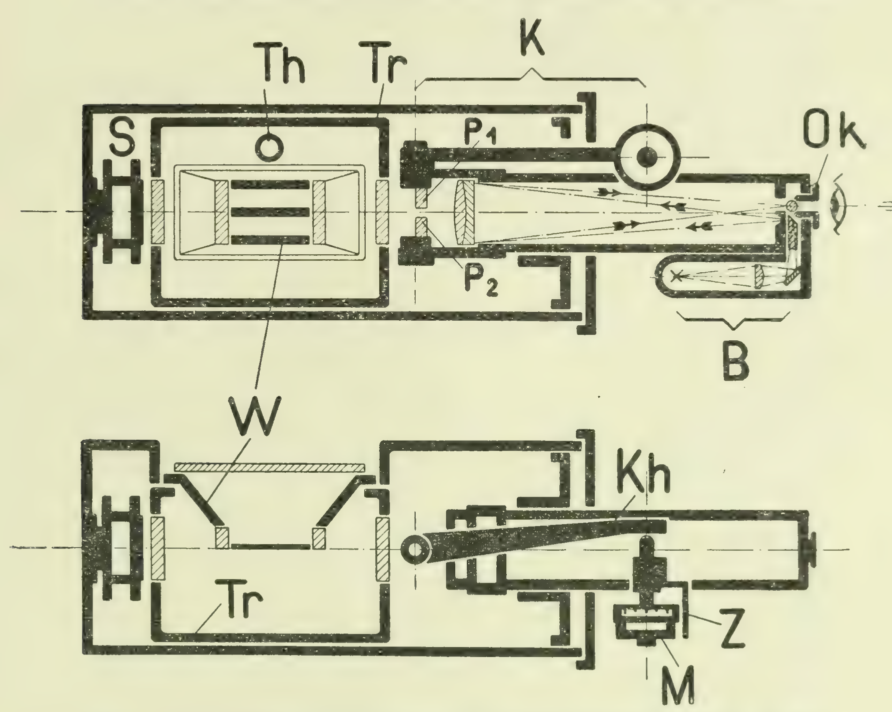


Fig. 2. Schematische Zeichnung des Flüssigkeitsinterferometers im Auf- und Grundriß. (Erklärung im Text.)

die obere Hälfte des parallelen Strahlenbüschels genau dasselbe Beugungsspektrum wie die untere Hälfte des Strahlenbüschels. Sind jedoch die Kammern mit Flüssigkeiten verschiedener Konzentration gefüllt, so ist die Interferenzerscheinung gegen ihre bisherige Lage verschoben, da die optische Weglänge in beiden Kammern verschieden ist. Durch Drehen der Schraube M kann man die beweglich angeordnete Platte P_1 des Kompensators K verstellen, wodurch der optische

Gangunterschied der beiden Hälften des Strahlenbüschels ausgeglichen wird. Man dreht so lange, bis die beiden oben erwähnten schwarzen Streifen, die das Maximum nullter Ordnung (das weiße) begrenzen, in dem oberen und unteren Bilde genau auf Koinzidenz stehen. Die Schraube *M* trägt eine Meßtrommel, deren Umdrehung man mit Hilfe ihrer Teilung sowie eines Umdrehungszählers *Z* ablesen kann. (Trommelteildifferenz). *Th* ist ein Tubus für ein Thermometer, daß die Temperatur des Temperierbades abzulesen erlaubt. Die Flüssigkeitskammern sind so konstruiert, daß sie auf das bequemste gefüllt und gereinigt werden können. Die Flüssigkeit ist gegen Verdunstung durch einen Glasdeckel geschützt. Sie werden zwecks Temperierausgleichs in einem Temperierbad angeordnet. Als Temperierflüssigkeit dient destilliertes Wasser. Die Flüssigkeitskammern werden für gewöhnlich in Kammerlängen von 5, 10, 20, 40 und 50 mm geliefert. Die mit denselben erhaltenen Werte verhalten sich wie 1 : 2 : 4 : 8 : 10.“ Die Messung des Refraktionswertes einer beliebigen Flüssigkeit gestaltet sich demnach sehr einfach. In die eine Hälfte der Doppelkammer wird eine Flüssigkeit von bekanntem Refraktionswert, wenn möglich destilliertes Wasser eingefüllt. In die andere Kammerhälfte kommt die zu untersuchende Flüssigkeit. Man wartet nun mit der Ablesung, bis die Temperaturunterschiede sich ausgeglichen haben, was daran zu erkennen ist, daß die Maxima und Minima des Interferenzspektrums in klarem Bilde geradlinig erscheinen. Dann dreht man an der Meßtrommel so lange, bis das obere Interferenzspektrum erscheint, dessen Minima nullter Ordnung nun mit denen des als Nullage dienenden unteren Spektrums zur Deckung gebracht werden. Dann braucht man an der Meßtrommel nur die betreffende Trommelteilzahl abzulesen, die wir als Interferometerwert bezeichnen wollen. Die einzige Schwierigkeit bereitet im Anfang die Einstellung der richtigen Interferenzstreifen, besonders wenn es sich darum handelt, konzentrierte Lösungen oder solche von kolloider Natur interferometrisch zu messen. Man erleichtert sich die Einstellung am besten dadurch, daß man nicht die b e i d e n Minimastreifen nullter Ordnung des oberen Spektrums auf die entsprechenden des unteren Interferenzbildes einstellt, sondern sich nur auf

den rechten schwarzen Streifen beschränkt (23). Nun sind die Minima nullter Ordnung nie rein schwarz, sondern die Außenränder zeigen stets einen farbigen Saum, den man allerdings nur bei genauer Beobachtung erkennen kann. Man stellt also den Streifen ein, dessen Innenrand rein schwarz ist, dessen rechte Kante jedoch farbig (meist bläulich) gesäumt ist. Auch ein wenig Geübter ist imstande, die korrespondierenden Streifen der beiden Interferenzspektren mit einer Genauigkeit von $^1/_{20}$ Streifenbreite einzustellen (24), was bei Benutzung einer 5 mm - Kammer einem Beobachtungsfehler von $\pm$ 0,05 pro Mille bei Salzgehaltsbestimmungen entspricht. Dieser Beobachtungsfehler kann also vernachlässigt werden. Größere Meßfehler würden entstehen, wenn man die Temperatur, bei der verschiedene Beobachtungen erfolgen, vernachlässigen wollte. Befindet sich in beiden Kammern dieselbe Flüssigkeit von gleicher Konzentration, so braucht man natürlich auf die Temperatur keine Rücksicht zu nehmen. Anders ist es, wenn in jeder Kammer sich eine andersartige Flüssigkeit befindet. Trägt man z. B. die Interferometerwerte auf einer Kurve ein, die bei der Messung einer Serumverdünnung (mit Aqua dest.) gegen destilliertes Wasser in der 5 mm-Kammer gewonnen worden sind (25), so sieht man, daß bei steigender Temperatur von 15 bis 37,6° eine Abnahme des Interferometerwertes um 36 Trommelteile eintritt. Und zwar verläuft die Kurve nicht geradlinig, sondern im Anfang stärker gekrümmt, während sie bei höherer Temperatur eine geringere Neigung zur Abszissenachse aufweist. Umgekehrt verläuft die Temperaturkurve, wenn die Serumverdünnung nicht gegen Wasser, sondern gegen physiologische Kochsalzlösung gemessen wird (26), und zwar verläuft die Temperaturkurve fast geradlinig, so daß auf jeden Gradunterschied etwa eine Differenz von einem Trommelteil kommt. Beträgt also der Temperaturunterschied bei zwei miteinander verglichenen Messungen nicht mehr als 0,5 bis 1° C, so braucht dieser kleine Meßfehler nicht berücksichtigt zu werden. Ein weiterer Versuchsfehler kann entstehen, wenn nicht streng darauf geachtet wird, daß jede Verdunstung der zu untersuchenden Flüssigkeit und der Vergleichsflüssigkeit unterbleibt. Ich habe diesen Fehler dadurch vermieden, daß ich die Unter-

suchungsflüssigkeit stets in gut paraffinierten Zentrifugenröhrchen halte, wodurch eine Verdunstung fast vollkommen verhindert wird. Man muß vor der Messung nur den Kunstgriff beobachten, daß man den Inhalt der Röhrchen gut durchschüttelt, damit etwa entstandenes Kondenswasser sich wieder mit der Flüssigkeit vereinigt. Die Vergleichsflüssigkeit (Aqua dest., Kochsalzlösung) hebe ich in Glasflaschen mit eingeschliffenem und gut eingefettetem Glasstöpsel vor Licht- und Wärmestrahlen geschützt auf. Noch nach Wochen bleibt der ursprünglich gefundene Interferometerwert der Vergleichsflüssigkeit auf diese Weise derselbe. Will man, wie Hirsch das in seinen Arbeiten getan hat, die gefundenen Interferometerwerte der einzelnen Bestandteile eines Gemisches rechnerisch verwerten, so muß noch ein Fehler ausgeschaltet werden, der in der Konstruktion des Interferometers selbst liegt (27). Messe ich beispielsweise Kochsalzlösungen verschiedener Konzentration aus, so daß ich Interferometerwerte erhalte, die den ganzen Meßbereich des Interferometers von 100 bis zu 3000 durchlaufen, so zeigt sich, daß der Wert für ein Streifenpaar nur etwa bis zum Interferometerwert 1500 gleichbleibt, während er von da an bis zum Interferometerwert 3000 stetig zunimmt. Ich habe diese Werte in Tabelle I für das von mir benutzte Interferometer eingetragen. Wie man sieht, beträgt der Wert eines Streifenpaares bei niedrigen Kochsalzkonzentrationen etwa 20 Trommelteile, während er bei Werten über 1500 bis zu 3000 auf 28 Trommelteile anwächst. Man kann sich so eine Korrektionstabelle anlegen, aus der für jeden abgelesenen Interferometerwert der betreffende Ausgleichswert entnommen werden kann (28). Größere Ablesungsfehler können weiterhin dadurch entstehen, daß die Flüssigkeitskammern nicht völlig trocken und sauber sind. Bei mehreren aufeinanderfolgenden Messungen verfahre ich deshalb in der Weise, daß ich die benutzte Kammer mindestens dreimal mit destilliertem Wasser ausspüle und dann mit Löschpapier und Gazebausch sorgfältig auswische. Wäre auch nur ein kleiner Rest der zuvor gemessenen Flüssigkeit in der Kammer vorhanden, so würde die Konzentration der neuzumessenden Flüssigkeit verändert und dadurch eine falsche Ablesung erzielt werden.

Tabelle I.

Interferometerwert	Wert eines Streifenpaares
2854	28
2460	28
2373	26
2226	26
1786	25
1720	24
1605	23
1476	22
747	20
370	20
181	20

Ich denke, daß die gegebene Schilderung der interferometrischen Methode genügen wird, um ihre Vorzüge sowohl wie ihre Fehlerquellen verstehen zu können. Um gute Resultate zu erhalten, ist es natürlich notwendig, daß man zuerst eine große Zahl von Messungen an verschiedenen Salzlösungen bekannten Gehalts ausführt, um so eine Kontrolle darüber zu gewinnen, ob man auch gelernt hat, die richtigen Interferenzstreifen einzustellen und die oben geschilderten Fehlerquellen zu vermeiden. Auch ich habe erst Hunderte von orientierenden Messungen ausgeführt, ehe ich dazu übergegangen bin, serologische Vorgänge in den Kreis meiner Untersuchungen einzubeziehen.

Eigene Versuche.

Ich beginne damit, meine Erfahrungen mitzuteilen, die ich bei der interferometrischen Messung beliebiger Sera gewonnen habe. Das hierfür verwandte Material entstammt dem Untersuchungsamt des hiesigen Instituts, ist also verschiedener Herkunft und verschiedenen Alters. So kommt es, daß der Interferometerwert der einzelnen Sera, die stets 10-fach verdünnt mit destilliertem Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung gemessen worden sind, recht verschieden ausfällt. Je älter ein Serum ist, um so konzentrierter wird es infolge von Verdunstung; kommen bakterielle Verunreinigungen hinzu, so erfolgt ebenfalls eine Konzentrationsvermehrung; auch ist es nicht gleichgültig, ob das Serum nüchtern oder einige Zeit nach reichlicher Nahrungsaufnahme gewonnen wird. Ich führe einige Beispiele aus der großen Zahl meiner orientierenden Messungen an, die in Tabelle II zusammengestellt sind.

Tabelle II.

Serum No.	Herkunft	Interferometerwert (I.W.)	Vergleichsflüssigkeit
1	Syphilisverdacht	599	phys. Kochsalzlösg.
2	Geheilte Lues	611	dgl.
3	Gesunde Wöchnerin	645	„
4	Gesunder Mann	704	„
5	Gesunde Frau	639	„
6	Gesunder Mann	634	„
7	Lues latens	617	„
8	Wöchnerin	720	„
9	Rheumatismus	655	„
10	Lues	687	„

Ebenso bekommt man erhebliche Unterschiede, wenn man derselben Person Serum zu verschiedenen Zeiten entnimmt. So zeigt mein eigenes Serum vormittags $^1/_2$ 10 Uhr 2 Stunden nach dem Frühstück entnommen, den Interferometerwert 755, während es abends $^1/_2$ 6 Uhr entnommen den Wert 701 aufweist, also einen Unterschied von 54 Trommelteilen. Geringere Differenzen findet man, wenn man aktives mit inaktiviertem Serum vergleicht. Bei meinem eigenen Blute habe ich da die Werte 755 und 765 gefunden, also eine Zunahme von 10 Trommelteilen nach der Inaktivierung, sicherlich die Folge einer Verdunstung. Größer werden die Unterschiede, wenn dasselbe Serum längere Zeit ohne völligen Luftabschluß steril aufgehoben wird. Während mein Serum z. B. frisch entnommen den Wert 755 anzeigt, ist es nach 9 Tagen auf den Wert 788 gestiegen; es hat also auch hier eine Konzentrationsvermehrung infolge von Verdunstung stattgefunden. Wie groß diese Ausschläge sind, sieht man am besten, wenn man 2 Kochsalzlösungen von genau bekannter Konzentration miteinander vergleicht, um so zu einer brauchbaren Vorstellung zu kommen, welchem Konzentrationsunterschied dieser 2 Salzlösungen eine Differenz des Interferometerwertes um einen Trommelteil entspricht. Beispielsweise hat eine 0,5-proz. Kochsalzlösung gegen destilliertes Wasser gemessen den Interferometerwert 376, eine 1-proz. Kochsalzlösung den Interferometerwert 752. Der Unterschied von 376 Trommelteilen entspricht also 5 g Kochsalz in einem Liter Aqua destillata; eine Trommelteildifferenz von einem Trommelteil würde also $^{5000}/_{376}$ mg Kochsalz pro Liter = 13,32 mg anzeigen.

Agglutination.

Meine Untersuchungen über die Konzentrationsänderung in einem Gemisch von agglutinierendem Immunserum und homologer Bakterienaufschwemmung erstrecken sich auf Typhus-, Paratyphus B-, Pseudodysenterie A- und Pseudodysenterie D-Bazillen.

In Tabelle III sind gleiche Mengen einer Typhusbazillenaufschwemmung und eines hochagglutinierenden Kaninchenimmunserums 1 : 50, 1 : 1000 und 1 : 5000 zusammengebracht worden. Die Bakterienaufschwemmung ist so hergestellt, daß eine 24-stündige Schrägagarkultur von Typhusbazillen mit 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt worden ist. 1 ccm dieser Bakterienemulsion ist mit der gleichen Menge Immunserumverdünnung 2 Stunden bei 37° gehalten worden, bis zur völligen Ausflockung. Der Interferometerwert ist sofort nach Vereinigung des Gemisches und 2 Stunden später nach erfolgter Ausflokung abgelesen. Es zeigt sich bei allen 3 Versuchen, daß der Interferometerwert des Gemisches Immunserum + Typhusbazillen abgenommen hat, d. h. es hat eine Konzentrationsverminderung stattgefunden. Dabei ist eine größere Abnahme des Interferometerwertes bei den höheren Konzentrationen des Immunserums festzustellen, während sie bei der Verdünnung des Immunserums 1 : 5000 nur noch 0,5 Trommelteile beträgt, also innerhalb der Fehlergrenzen des Apparates liegt.

Tabelle III.

Immunserumverdünnung	Interferometerwert vor der Ausflockung	Interferometerwert nach der Ausflockung	Differenz	Vergleichsflüssigkeit
Typhus-Immunser.				
1:50	1425	1408	—17	Aqu. dest.
1:1000	106	90	—16	0,85 proz.
1:5000	24½	24	—0,5	NaCl-Lsg.

In Tabelle IV ist das gleiche für Paratyphus B-Bazillen und homologes Immunserum in den Verdünnungen 1 : 10 und 1 : 50 ausgeführt. Auch hier ist bei der stärkeren Konzentration eine etwas größere Trommelteildifferenz nach der Ausflockung zu beobachten als bei der Immunserumverdünnung 1 : 50. Daß die hierbei gefundenen Werte gut stimmen, geht

daraus hervor, daß ich den Wert 988 bei der Immunserumverdünnung 1 : 50 fast genau berechnen kann, wenn ich die Interferometerwerte für Immunserum = 936 und Bazillenaufschwemmung = 1046 nach der Mischungsformel $x = \frac{a+b}{2}$ addiere und durch 2 dividiere. Ich erhalte dann den Wert $\frac{1982}{2} = 991$, also eine Differenz von 3 Trommelteilen gegenüber dem beobachteten Wert 988. Es ist eben nicht möglich, die Verdünnungen so genau zu pipettieren, daß man völlig übereinstimmende Werte erhalten könnte. In einer dritten Versuchsreihe habe ich die Konzentrationsänderung gemessen, die in einem Gemisch von Pseudodysenterie A und Pseudodysenterie D-Bazillen + homologem Immunserum nach der Ausflockung eintritt. Auch hier zeigen sich, bei Pseudodysenterie A-Bazillen allerdings nur kleine Differenzen im Sinne einer Konzentrationsverminderung.

Tabelle IV.

Immunserumverdünnung	Interferometerwert vor der Ausflockung	Interferometerwert nach der Ausflockung	Differenz	Vergleichsflüssigkeit
Paraty. B-Immunser.				
1 : 10	1728	1721	—7	Aqu. dest.
1 : 50	988	984,5	—3,5	,, ,,

Wie verhält sich nun das Gemisch Immunserum + Bakterien, wenn die Ablesung nicht nach 2 Stunden, sondern erst nach längerer Zeit erfolgt? Eine deutliche Zunahme der Konzentration, wie sie Hirsch in seiner Arbeit über Typhusimmunserum und Fickersches Diagnostikum angibt, habe ich bei meinen Versuchen, die sich bis auf 48 Stunden ausdehnen, nicht beobachten können. Als Beispiel führe ich einen Agglutinationsversuch mit Pseudodysenterie D-Bazillen an, bei dem auch noch 48 Stunden nach Beginn des Versuches eine Konzentrationsverminderung um 8—9 Trommelteile festgestellt worden ist. Ich möchte aus meinen Versuchen deshalb vorläufig nur den Schluß ziehen, daß bei dem Vorgang der Agglutination irgend etwas aus dem Gemisch Immunserum + Bakterien herausgenommen wird; denn sonst könnte nicht eine Konzentrationsverminderung eintreten. Der

Gedanke liegt wohl am nächsten, daß tatsächlich Bestandteile des Immunserums sich mit den Bakterien verbinden, und daß dann erst die Ausflockung zustande kommt, vielleicht infolge einer Reaktionsänderung, die in dem Gemisch Immunserum + Bakterienaufschwemmung eintritt. Den von Hirsch in seinen Versuchen registrierten Abbau habe ich nicht feststellen können, was ja vielleicht auch damit zusammenhängt, daß Hirsch mit dem Fickerschen Diagnostikum gearbeitet hat, während ich meine Versuche mit lebenden Bazillen angestellt habe. Einen Einwand möchte ich jedenfalls gegen die Hirschschen Ergebnisse machen, nämlich den, daß er den Wert Immunserum + Diagnostikum vor der Ausflockung errechnet hat. Ein kleiner Meßfehler kann bei der Berechnung zu größeren Differenzen führen, vor allem, da es nach meinen Erfahrungen nicht möglich ist, die entsprechenden Immunserumverdünnungen mit genügender Genauigkeit herzustellen. Nur mit reichsgeeichten Pipetten, die Hirsch meines Wissens nicht benutzt hat, wäre das ausführbar. Nur so ist mir die Erscheinung verständlich, daß bei Hirsch die Differenz der Interferometerwerte vor und nach der Ausflockung bei einer Immunserumverdünnung 1 : 10 zehnmal kleiner ist als bei der stärkeren Verdünnung 1 : 100 und das bei noch stärkeren Verdünnungen des Immunserums die Differenz noch größer wird; den höchsten Wert findet er bei der Verdünnung 1 : 200. Eine Beziehung der Immunserumverdünnung zur Stärke des Abbaues besteht also demnach nicht. Wichtiger ist die von mir gefundene Tatsache, daß der konzentrierten Immunserumverdünnung auch eine höhere Trommelteildifferenz nach der Ausflockung entspricht. Es bedarf weiterer Versuchsreihen, die ich mir vorbehalte, um eine hierbei etwa bestehende Gesetzmäßigkeit aufzudecken.

Komplementbindung.

In einer weiteren Versuchsreihe folgen nun die Ergebnisse, die ich bei der interferometrischen Untersuchung eines Immunserums + Antigen + Komplement gefunden habe. Ich habe als Antigen einen Typhusbazillenextrakt hergestellt, dessen halbe unterhemmende Dosis mit einer entsprechend ausgewerteten Serum- und Komplementmenge im Hauptversuch

zusammengebracht wird. Das Gemisch der 3 Komponenten wird sofort interferometrisch gemessen und nach einstündigem Digerieren bei 37° nochmals abgelesen. Es wird also die Konzentrationsänderung festgestellt, die sich nach der Komplementbindung voraussichtlich einstellen muß. In Tabelle V sind beim ersten Versuch 0,5 ccm Typhusimmunserum unverdünnt mit 0,3 ccm Antigen + 0,2 ccm physiologischer Kochsalzlösung und 0,3 Komplement 1 : 10 + 0,2 ccm physiologischer Kochsalslösung zusammengebracht. Es zeigt sich da, daß eine Konzentrationsvermehrung um 7 Trommelteile nach einstündiger Bindung eingetreten ist. Es versteht sich. daß dieses Gemisch, nach der Messung mit hämolytischem System versetzt, eine spezifische Hemmung ergeben hat.

Tabelle V.

Mengen von Antigen, Typhusimmunserum und Komplemente	Interferometerwert vor der Bindung	Interferometerwert nach der Bindung	Differenz	Vergleichsflüssigkeit
Typhus-Immunserum 0,5 + 0,3 Antigen + 0,3 Komplement	3035	3024	+ 7	Aqu. dest.
Typhus-Immunserum 0,2 + 0,3 NaCl + 0,35 Komplement + 0,15 NaCl + 0,125 Antigen + 0,375 NaCl	1222	1231	+ 9	„ „

Im zweiten Versuch ist das Gleiche wiederholt, nur mit anderem Antigen, so daß die Mengenverhältnisse sich geändert haben, und zwar sind 0,2 ccm Typhusimmunserum + 0,3 ccm 0,85-proz. Kochsalzlösung mit 0,125 ccm Antigen + 0,375 0,85-proz. Kochsalzlösung und 0,35 Komplement + 0,15 Kochsalzlösung zusammengebracht worden. Die im besonderen Vorversuch ermittelte Komplementeinheit beträgt in diesem Falle 0,2. Auch dieses Gemisch hat nach erfolgter Komplementbindung, mit hämolytischem System versetzt, eine spezifische Hemmung der Hämolyse ergeben. Auch hier ist bei der interferometrischen Messung nach der Komplementbindung eine Konzentrationsvermehrung eingetreten, und zwar um 9 Trommelteile, also fast der gleiche Befund wie beim ersten Versuch. Wie ist es nun zu verstehen, daß bei der Komplementbindung eine Konzentrations*vermehrung* eintritt, während man doch eigentlich das Gegenteil erwarten

müßte, wenn wir uns die Auffassung zu eigen machen, daß es sich bei der Komplementbindung um eine Adsorptionserscheinung handelt, die ja zu einer Konzentrationsverminderung führen müßte. Ich möchte diese interessante Frage erst später besprechen, im Zusammenhang mit den Ergebnissen, die ich bei der Untersuchung der ersten Phase der Wassermannschen Reaktion und der Flockungsreaktion nach Sachs-Georgi gefunden habe.

Wassermannsche Reaktion und Flockungsreaktion nach Sachs-Georgi.

Bei der interferometrischen Untersuchung der ersten Phase der Wassermannschen Reaktion ist die Versuchsanordnung genau die gleiche wie bei den soeben beschriebenen Messungen. Die Ablesung des Interferometerwertes erfolgt sofort nach Mischung der 3 Komponenten Serum + Antigen + Komplement, die zweite Messung eine Stunde später nach vollzogener Komplementbindung. Bei Durchsicht der Tabelle VI fällt zunächst auf, daß die Differenzen bei den einzelnen Sera nicht vollkommen gleichsinnig verlaufen; während bei zwei positiven Seren eine Konzentrationsvermehrung festzustellen ist, zeigt sich bei einem eine geringe Verminderung. Bei Serum 4 ist überhaupt keine Aenderung der Konzentration eingetreten. Ebenso ergibt sich bei dem zum Vergleich an-

Tabelle VI.

	Interferometerwert des Gemischs A+S+K	Interferometerwert nach 1 Stunde	Differenz	Vergleichsflüssigkeit	Temperaturdifferenz	Interferometerwert nach 1 St. nach Temperaturkorrektur
Serum 1 positiv+++	2325	2323	—2	0,85 NaCl-Lösung	+0,6°	2324/25
Serum 2 positiv+++	1027,5	1042	+14,5	dgl.	0°	1042
Serum 3 positiv+++	1586	1599	+13	,,	—0,8°	1597
Serum 4 positiv+++	1802	1802	0	Aqu. dest.	+0,3°	1802/03
Serum 5 negativ	2327	2325	—2	dgl.	0°	2325

geführten negativen Serum No. 5 eine nur geringe Differenz, und zwar im Sinne einer Konzentrationsverminderung. Serum 4 würde jedoch, wenn ich die nötige Temperaturkorrektur anbringe, auch noch eine kleine Konzentrationsvermehrung anzeigen. Daß tatsächlich während der ersten Phase der Wassermannschen Reaktion eine Konzentrationsvermehrung nachweisbar ist, läßt sich am besten aus Tabelle VII ersehen, wo die Konzentrationszunahme in dem Gemisch zeitlich verfolgt worden ist.

Tabelle VII.

Nach welcher Zeit?	Interferometerwert	Vergleichsflüssigkeit	Temperatur
sofort	2330	Aqu. dest.	22,1
nach 15 Min.	2335	" "	22,2
" 25 "	2340	" "	22,2
" 1 Std.	2342	" "	22,9
" 2 "	2342	" "	22,5

Man sieht hier sehr schön, wie der Interferometerwert des Gemisches bis zu der nach einer Stunde erfolgten Komplementbindung kontinuierlich ansteigt, um dann zum Stillstand zu kommen. Und zwar geht die Konzentrationsvermehrung der ersten halben Stunde der „Bindung“ rascher vor sich als in der zweiten halben Stunde. Wenn es sich um eine einfache Salzlösung handelte, so könnte man denken, daß hier ein allmählich sich abspielender Verdunstungsvorgang registriert worden ist. Daß dem nicht so ist, geht daraus hervor, daß das Serum No. 5 (s. Tabelle VI), das nach der Komplementbindung den Wert 2325 anzeigt, nach 5-stündigem Stehen ohne Luftabschluß auf den Wert 2253 gesunken ist, eine infolge von Verdunstung eintretende Differenz sich also im entgegengesetzten Sinne äußert, wie in dem soeben angeführten Versuch. Es ist nun interessant, daß der Interferometerwert bei einem Wassermann-negativen Serum sich während der gleichen Beobachtungszeit gleich bleibt. Dasselbe habe ich merkwürdigerweise auch einmal bei einer unspezifischen Hemmung beobachten können (Serum einer vollkommen gesunden Schwangeren), bei der der Interferometerwert sich noch nach 5 Stunden nicht verändert hat (s. Tabelle VIII).

Tabelle VIII.

Nach welcher Zeit?	Interferometerwert	Vergleichsflüssigkeit	Temperatur	Korrigierter Wert
sofort	1573—4	Aqua dest.	21,2	1573—4
nach 15 Min.	1573—4	„ „	21,2	1573—4
„ 27 „	1573—4	„ „	21,4	1573—4
„ 1 Std.	1573—4	„ „	21,6	1573—4
„ 2 „	1573—4	„ „	22,0	1573—4
„ 5 „	1572	„ „	22,5	1573

Bevor ich auf diese bemerkenswerten Befunde eingehe, möchte ich nun eine Anzahl interferometrischer Messungen anführen, die ich bei der Untersuchung der Flockungsreaktion nach Sachs-Georgi gefunden habe. Aus Tabelle IX sind die Interferometerwerte vor und nach der Ausflockung zu ersehen.

Tabelle IX.

Serum No.	Interferometerwert vor der Ausflockung	Interferometerwert nach der Ausflockung	Differenz	Temperaturdifferenz	Interferometerwert nach der Ausflockung mit Temperaturkorrektion
1 positiv	2177	2177	0	+ 0,9°	2178
2 „	2217	2217	0	+ 0,6°	2217—18
3 „	2152	2161	+ 9	+ 0,2°	2161
4 „	2023	2021	— 2	0	2021
5 „	2110	2132	+ 22	— 1,0°	2131
6 „	2120	2132	+ 12	— 1,1°	2131
7 „	2032	2036	+ 4	— 0,2°	2036
8 negativ	2194	2194	0	0	2194

Es zeigt sich also, daß bei 4 nach Sachs-Georgi positiven Seren eine deutliche Konzentrationsvermehrung eingetreten ist, bei 2 Seren eine Veränderung ausgeblieben und bei einem Serum eine minimale Konzentrationsverminderung zu beobachten ist. Bringe ich auch hier wieder die Temperaturkorrektur an, so zeigt sich auch bei den Seren No. 1 und 2 eine geringe Konzentrationsvermehrung. Um den Einfluß der Verdunstung auch hier festzustellen, habe ich das Gemisch Serumverdünnung + Extrakt in einem gesprungenen und schlecht paraffinierten Zentrifugenröhrchen angesetzt. Der ursprüngliche Interferometerwert des Gemisches ist dabei nach 1 Stunde von 1920 Trommelteilen auf 1730 gefallen, also ein sehr großer Unterschied. Liegt es da nicht nahe, die mini-

male Konzentrationsverminderung bei Serum No. 4 als kleine Versuchsfehler zu buchen? Es ist selbstverständlich, daß die 0,85-proz. Kochsalzlösung, die bei den letzten Versuchen als Vergleichsflüssigkeit gedient hat, vor der ersten und nach der zweiten Ablesung des Gemisches gegenüber destilliertem Wasser ausgemessen worden ist. Eine Konzentrationsveränderung der Vergleichsflüssigkeit kommt daher als Versuchsfehler nicht in Frage. Bemerkenswert ist es, daß bei negativen Seren, bei denen ja eine Ausflockung ausbleibt, eine Konzentrationsänderung nicht eintritt (s. Tabelle IX, Serum No. 8).

Auch bei diesen letzten Messungen der Flockungsreaktion nach Sachs-Georgi ist also eine Konzentrationsvermehrung nachzuweisen, die ich geneigt bin, als Zeichen eines Antigenabbaues durch entsprechende Stoffe (Fermente?) des Syphilitikerserums aufzufassen. Daß im Luetikerserum tatsächlich solche Abbaustufen vorhanden sind, wird von verschiedenen Autoren angenommen. Ich verweise auf meine Arbeit (30) über Wassermannsche Reaktion und Eiweißabbaustufen im Luetikerserum, in der ich die Resultate von Much und Embden (31), Mahlo (32), Much und Schmidt (33) nachgeprüft habe und wo gezeigt wird, daß Wassermann-positive Sera, die sorgfältig enteiweißt worden sind, in einem hohen Prozentsatz eine positive Ninhydrinreaktion geben. Die Autoren fassen diese Erscheinung so auf, daß im Luetikerserum Eiweißabbauprodukte vorhanden sind, die die Reaktion des Serums verändern und so zur „Bindung“ des Komplements führen sollen. Das gleiche erfolgt nun auch im Reagenzglas, wenn man das Luetikerserum mit dem passenden Substrat zusammenbringt. So wird es auch verständlich, daß man mit allen möglichen unspezifischen Extrakten eine Komplementbindung erhält, eine Erscheinung, die mit Hilfe der bisherigen Vorstellungen ebensowenig wie durch die Entdeckung des neuen Wassermannschen Lipoidantikörpers (34) zu erklären ist. Die sogenannten unspezifischen Hemmungen, die man bei einer Reihe von Infektionskrankheiten und anderen chronischen verzehrenden Krankheiten zu sehen bekommt, sind auf Grund der Vorstellung, daß Abwehrfermente hier tätig sind, leichter zu verstehen, als es bisher möglich gewesen ist.

Einen Einwand möchte ich nun noch widerlegen, der gegen diese Deutung meiner Versuche erhoben werden kann. Das ist die Frage, ob man eine Autolyse des Serums annehmen darf, die ja ebenfalls zu einer Konzentrationsvermehrung führen müßte. Bereits Abderhalden (35) hat dies verneint. Ebenso hat Hirsch (36) mit Hilfe der interferometrischen Methode einwandfrei nachgewiesen, daß eine Autolyse des Serums niemals eintritt. Wo ein Abbau festzustellen ist, handelt es sich stets um eine Verunreinigung des nicht mehr sterilen Serums, das durch seinen Bakteriengehalt einen Abbau erfährt. Auch ich kann diese Ansicht nur bestätigen. Ich habe noch nach Wochen bei demselben unter aseptischen Kautelen gewonnenen und bei Luftabschluß steril aufgehobenen Serum stets wieder denselben Interferometerwert wie im Anfang gefunden, so daß ich zu der Ueberzeugung gekommen bin, daß es eine Autolyse des Serums nicht gibt.

Wie kommt es nun aber, daß wir bei der Flockungsreaktion nach Sachs-Georgi eine oft massige Ausflockung beobachten, daß aber bei der interferometrischen Messung vor und nach der Ausflockung eine entsprechende Differenz nicht wahrgenommen werden kann? Wir müßten ja eigentlich erwarten, daß nach der Ausflockung eine erhebliche Konzentrationsverminderung abzulesen wäre, während in Wirklichkeit der Ausschlag nach der entgegengesetzten Seite hinzeigt. Die Erklärung hierfür ist darin zu suchen, daß der Flockungsniederschlag nicht aus den wasserlöslichen Bestandteilen des Serums oder des Antigens herstammt, sondern wie Epstein und Paul (37) es für die dritte Modifikation der Flockungsreaktion nach Meinicke gezeigt haben, aus Lipoiden des Extraktes besteht; denn der Niederschlag läßt sich, im Wasserbad erhitzt, in 95-proz. Alkohol vollkommen auflösen. Auch Tannenberg (39) weist in seiner jüngst erschienenen Arbeit nach, daß der Flockungsniederschlag bei der Sachs-Georgischen Reaktion lediglich aus Lipoiden besteht. Allerdings ist er der Meinnng, daß diese Lipoide sowohl aus dem Extrakt wie aus dem Luetikerserum stammen. Auch Scheer (40) kommt zu demselben Resultat; nur gibt er noch einen Eiweißgehalt von 5—10 Proz. der Flocken an, was Tannenberg jedoch darauf zurückführt, daß Scheer die Aetherextraktion

der Flocken nicht genügend lange Zeit ausgedehnt hat. Diese Extraktlipoide befinden sich nun in der mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellten opaleszenten Verdünnung bereits in einer Phase, die nicht mehr einer echten Lösung entspricht und die nur eines Anstoßes bedarf, um die Extraktlipoide ausflocken zu lassen. Auch hier ist es wohl das nächstliegende, als Ursache der Ausflockung eine Reaktionsänderung anzunehmen, die vielleicht hervorgerufen wird durch Eiweißabbaustufen, deren Entstehung wiederum auf Abwehrfermente zurückzuführen wäre. Leider ist es mir nicht gelungen, nachzuweisen, auf Kosten welcher Substanzen in dem Gemisch Antigen + Luetikerserum die Konzentrationsvermehrung eintritt. Eine größere Reihe von Versuchen, die einzelnen Bestandteile des Antigens und des Serums voneinander zu trennen und für sich interferometrisch zu messen, haben kein befriedigendes Ergebnis gehabt. Meine besondere Aufmerksamkeit habe ich dabei dem sogenannten unlöslichen Serumglobulin gewidmet, dessen Interferometerwert jedoch so viel größer ist als die in meinen Versuchen gefundene Konzentrationsänderung beträgt, daß eine Beziehung irgendwelcher Art zwischen ihr und dem Serumglobulin auf diesem Wege nicht zu erkennen ist. Ich verzichte deshalb darauf, die betreffenden Versuchsreihen hier anzuführen. Von besonderem Interesse ist nun noch die Frage, wie sich der Widerspruch zwischen meinen Versuchen, die bei der ersten Phase der Wassermannschen Reaktion eine Konzentrationsvermehrung ergeben, und der allgemeinen Ansicht lösen läßt, daß bei der Komplementbindung eine Adsorption des Komplements erfolgt, infolgedessen also eine Konzentrationsverminderung (38) zu erwarten wäre. Zunächst ist da zu sagen, daß es mit Hilfe der interferometrischen Methode natürlich nur möglich ist, Augenblickswerte zu messen, die immer nur den Endeffekt der zwischen den einzelnen Bestandteilen erfolgenden Wechselwirkung anzeigen, ohne die Vorgänge im einzelnen wiederzugeben. Vergleicht man nun aber die zu verschiedenen Zeiten gefundenen Werte der Tabelle VII, so ist es entschieden auffallend, daß die Konzentrationsvermehrung nach den ersten 25 Minuten langsamer von statten geht als in der ersten Zeit des Reaktionsverlaufes, um nach einer

Stunde zum Stillstand zu kommen. Ich möchte daraus ablesen, daß mindestens zwei entgegengesetzt verlaufende Vorgänge sich in der ersten Phase der Wassermannschen Reaktion nebeneinander abspielen. Einmal ein Abbau, der zu einer Konzentrationsvermehrung führt, zweitens der allmählich verlaufende Vorgang der Adsorption des Komplements, der mit einer Konzentrationsverminderung einhergeht. Der erste Prozeß überwiegt im Anfang der Reaktion den zweiten Vorgang, bis es nach vollzogener Bindung zu einem Stillstand des Systems kommt. So wird es auch verständlich, daß die Differenz des Interferometerwertes vor und nach der Komplementbindung bei den einzelnen positiven Seren verschieden groß ausfällt, je nachdem der Vorgang des Abbaues den der Komplementadsorption mehr oder weniger deutlich übertrifft.

Zusammenfassung.

1) Mit Hilfe des Zeißschen Flüssigkeitsinterferometers läßt sich mit Sicherheit feststellen, daß es eine Autolyse des Serums nicht gibt. Der Interferometerwert (Brechungsindex) verschiedener Sera ist niemals gleich groß. Ebenso zeigt ein Serum, das zu verschiedenen Zeiten entnommen ist, niemals den gleichen Interferometerwert.

2) Es gelingt mit Hilfe des Interferometers festzustellen, daß bei der Agglutination von Typhus-, Paratyphus B-, Pseudodysenterie A- und Pseudodysenterie D-Bazillen durch homologes Immunserum in dem Gemisch Immunserum + Bazillenaufschwemmung nach erfolgter Ausflockung eine Konzentrationsverminderung eintritt. Je stärker die Verdünnung des Immunserums ist, um so geringer ist auch die Konzentrationsverminderung des Gemisches. Ob dabei eine bestimmte Gesetzmäßigkeit besteht, müssen weitere ausgedehnte Untersuchungen lehren.

Läßt man das Immunserum längere Zeit als 2 Stunden auf die Bazillenaufschwemmung einwirken (bis 48 Stunden), so tritt eine Konzentrationsvermehrung, deren Ursache vielleicht in einem fermentativen Antigenabbau zu suchen wäre, wie Hirsch behauptet, nicht ein.

3) Bei der Komplementbindung zwischen Typhusbazillenextrakt (Antigen) und Typhusimmunserum tritt nach einstün-

diger Bindung bei 37° eine Konzentrationsvermehrung des Gemisches Antigen + Immunserum + Komplement ein. Auch hier könnte man daran denken, daß durch Fermente des Immunserums ein Antigenabbau erfolgt, der zu einer Konzentrationsvermehrung führt. Diese Abbaustufen sind es vielleicht, die eine Reaktionsänderung im Gemisch und dadurch die Adsorption des Komplements hervorrufen.

4) Sowohl bei der Flockungsreaktion nach Sachs-Georgi wie bei der ersten Phase der Wassermannschen Reaktion kommt es bei positiven Seren meist zu einer Konzentrationsvermehrung, die bei negativen Seren ausbleibt.

Bei der Komplementbindung (ersten Phase der Wassermannschen Reaktion) erfolgt die Konzentrationszunahme in dem Gemisch Antigen + Syphilitikerserum + Komplement in der ersten halben Stunde schneller als in der zweiten halben Stunde der Bindung. Man muß deshalb daran denken, daß hier verschiedene gleichzeitig nebeneinander herlaufende Vorgänge in ihrem Endefft registriert werden: einmal ein Antigenabbau, der zur Konzentrationsvermehrung führt, zweitens die Adsorption des Komplements, die eine Konzentrationsverminderung hervorruft. So wird es vielleicht verständlich, daß die Differenz des Interferometerwertes vor und nach der Komplementbindung bei den einzelnen positiven Seren verschieden groß ausfällt, je nachdem der Vorgang des Antigenabbaues den der Komplementadsorption mehr oder weniger deutlich übertrifft.

5) Welche Rolle die Aenderung der Reaktion bei diesen Vorgängen spielt, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Literaturverzeichnis.

1) Abderhalden, Die Abwehrfermente. Berlin, Springer, 1911.
2) — ebenda.
3) — ebenda.
4) Wieland, Ueber das Auftreten von Invertin im Blute.
5) Abderhalden und Rona, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 75, 1911, p. 30.
6) van Calcar, Dialyse, Eiweißchemie und Immunität. Leipzig, J. A. Barth, 1908. (Zitiert nach Langenstraß, Literaturangabe No. 19.)
7) F. Umber, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 25, 1898, p. 258.

8) Chittenden and Hartwell, Am. Journ. of Physiol., Vol. 11, 1890. p. 435.
9) E. Fischer und Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 39. 1903, p. 81.
10) C. Oppenheimer und H. Aron, Hofm. Beitr., Bd. 4, 1903, p. 279.
11) H. Chick and C. Martin, On the heat coagulation of the proteins. Am. Journ. of Physiol., Vol. 45, 1912, p. 294 (zitiert nach No. 19).
12) Obermayer und Pick, Hofm. Beitr., Bd. 7, 1906, p. 1155/56.
13) Hirsch, Fermentstudien. Jena, Gustav Fischer, 1914, p. 12—16.
14) — Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. 91, 1914.
15) Löwe, Physikal. Zeitschr., 1910, No. 23, p. 1047—51.
16) — Zeitschr. f. Instrumentenkunde, 1910, Heft 11.
17) Hirsch, Fermentforschung, Bd. 2, 1919, Heft 4, p. 269—89.
18) — Fermentforschung, Bd. 2, 1919, Heft 4, p. 290—93.
19) Langenstraß, Fermentforschung, Bd. 3, Heft 1, p. 1—43.
20) Hirsch und Löwe, Fermentforschung, Bd. 3, 1919, Heft 3, p. 311—17.
21) — — Fermentforschung, Bd. 1, 1914, p. 33—46.
22) Mayer-Pullmann, Untersuchungen mit Hilfe der interferometrischen Methode bei Rindertuberkulose. Inaug.-Diss. Gießen, 1919.
23) Langenstraß, siehe Literaturangabe No. 19, p. 19.
24) Löwe, Physik. Zeitschr., 11. Jahrg. 1910, No. 23, p. 1047—51.
25) — ebenda p. 17.
26) — ebenda p. 18.
27) Langenstraß, siehe Literaturangabe No. 11, p. 12.
28) — siehe Literaturangabe No. 11, p. 43.
29) Schmidt, Technik immunbiologischer Untersuchungsmethoden.
30) Bachmann, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 33, 1921, Heft 3.
31) Much und Embden, Beitr. z. Klin. d. Infektionskrankh., Bd. 31, p. 119.
32) Mahlo, ebenda, 1913, p. 101—109.
33) Much und Schmidt, Deutsche med. Wochenschr., 1921, No. 20. p. 552.
34) v. Wassermann, Berl. klin. Wochenschr., 1921, No. 9.
35) Abderhalden, siehe Literaturangabe No. 1.
36) Hirsch, Fermentstudien. Jena, Gustav Fischer, 1917, p. 36.
37) Epstein und Paul, Arch. f. Hyg., 1921, Heft 3.
38) Hirsch, Kritik der interferometrischen Methode.
39) Tannenberg, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 32, 1921, Heft 5.
40) Scheer, Münch. med. Wochenschr., 1921, No. 2.

[Aus dem Bakteriologischen- und Seruminstitut Dr. Schreiber, Landsberg a. Warthe.]

Die Alkalität der Nährböden, gemessen nach der Michaelisschen Indikatorenmethode, in ihren Beziehungen zum Bakterienwachstum.

Von Dr. **Stickdorn**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 29. Oktober 1921.)

Schon in früheren Arbeiten[1][2]) vermochte Michaelis die Bedeutung der Theorie der Wasserstoffionenkonzentration für die praktische Bakteriologie zu beweisen. Nunmehr (Michaelis, Die Prüfung der Alkalität in Nährböden, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 32, p. 194) berichtet derselbe Autor über eine von den alten Methoden abweichende und ihnen erheblich überlegene Alkalitätsprüfung von Bakteriennährböden vermittels einer eigenen Indikatorenmethode. Dabei läßt sich der Farbgrad, d. h. das Verhältnis der Indikatormenge in einem Röhrchen mit bekannter Laugeverdünnung zu der Indikatormenge in dem zu untersuchenden Nährboden, zahlenmäßig ausdrücken und aus ihm der Wasserstoffexponent p_H berechnen oder bequemer aus einer beigegebenen Tabelle ablesen.

Als Indikator wird meta-Nitrophenol empfohlen. Die Eigenfarbe der Nährböden wird durch Verdünnung und nach dem Walpoleschen Prinzip dadurch aufgehoben, daß man in einem einfachen Apparat, dem sogenannten Komparator, die Röhrchen gegen eine Matt- und Blauscheibe betrachtet. Auf diese Weise ergeben sich je nach der Stärke der Gelbfärbung durch den Indikator alle Farbunterschiede von blau über grün nach gelb und läßt sich der Vergleich mit den Indikatorverdünnungen, welche man fertig beziehen kann, leicht ausführen.

---

1) Michaelis, Die Säureagglutination der Bakterien, insbesondere der Typhusbazillen. Deutsche med. Wochenschr., 1911, No. 21.

2) Michaelis und Marcora, Die Säureproduktivität des Bacterium coli. Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 14, 1912, p. 170.

Da die früher geübte Alkalitätsprüfung der herzustellenden Nährböden mit Lackmusblau und Phenolphthalein, wie sie z. B. Heim[1]) angibt, zuweilen im Stiche läßt und umständliche Titrationen im Großbetriebe nicht durchführbar sind, habe ich an etwa 100 verschiedenen Nährböden während der einzelnen Herstellungsphasen Parallelprüfungen mit Lackmusblau und Phenolphthalein nach der alten Methode und mit meta-Nitrophenol nach Michaelis gemacht. Indem ich das Ergebnis dieser Untersuchungen voranstelle und von der Veröffentlichung der ausführlichen Tabellen absehe, muß ich bestätigen, daß die Methode nach Michaelis an Genauigkeit die älteren Verfahren bei weitem übertrifft und daß sie nach kurzer Uebung fast ebenso einfach auszuführen ist. Insbesondere bietet die Prüfung dunkelgefärbter Nährböden keine Schwierigkeiten mehr, während früher der dem Wachstumoptimum der meisten Bakterien ungefähr entsprechende Phenolphthalein-Neutralpunkt bzw. der leiseste Umschlag nach rosa in der dunklen Farbe verloren ging und eine Ueberalkalisierung unvermeidbar war. Andererseits ist Lackmusblau bei sehr schwacher Alkalität amphoter und der sich bei höherer Alkalität ergebende Farbenton in seiner Beurteilung zu sehr vom subjektiven Empfinden des Untersuchenden abhängig. Weiter ist es nunmehr möglich, die Alkalität durch eine einfache Zahl schnell auszudrücken, ohne erst zeitraubende Titrationen mit n. NaOH und n. HCl vornehmen zu müssen. Dies ist von besonderem Vorteil, wenn es sich nicht nur darum handelt, z. B. bei einer fertigen Bouillon die Alkalität zu bestimmen, sondern während der Herstellung die Alkalisierung des Nährbodens bis zum gewünschten Grade vorzunehmen.

Auch Michaelis' Hinweis auf den Nachteil der üblichen Alkalisierung mit Soda gegenüber der mit Natronlauge nach dem Kochen der mit 0,3 Proz. Kochsalz und 0,2 Proz. sekundärem Natriumphosphat versetzten Bouillon hat sich mir durchaus bewährt. Die nach dem Zusatz von Soda freiwerdende Kohlensäure täuscht einen niederen Alkalitätsgrad als den schon vorhandenen vor, so daß Ueberalkalisierungen wenigstens bei den mittleren und höheren Alkalitätsgraden

1) Heim, Lehrbuch der Bakteriologie. Stuttgart 1898.

fast die Regel bilden. So zeigte z. B. eine mit Soda auf 7,4 p_H eingestellte Bouillon nach zweimaligem Sterilisieren nicht mehr diesen Titer, sondern 7,7 p_H, eine andere ging von 7,6 auf 8,0, eine dritte von 7,8 auf 8,4 p_H. Da 7,8 p_H noch einem Wachstumsoptimum für die meisten Bakterien entspricht, bei 8,4 p_H aber sehr viele Bakterien nur spärlich oder überhaupt nicht mehr wachsen, war es nicht verwunderlich, wenn in dem zuletzt erwähnten Falle die fertige Bouillon den praktischen Ansprüchen nicht genügte. Dagegen behielten die mit Kochsalz und Natriumphosphat gekochten und mit Natronlauge alkalisierten Nährböden ihren Alkalitätsgrad entweder unverändert bei, auch nach dreimaligem Sterilisieren, oder er sank um 0,1 p_H bis höchstens 0,2 p_H in den höheren Graden z. B. von 7,6 auf 7,5, von 8,0 auf 7,9, von 8,2 auf 8,0, was jedoch praktisch ganz unerheblich war.

Weiter stellte ich mir die Aufgabe, für eine größere Anzahl von Bakterienarten das Alkalitätsoptimum in Bouillon festzustellen. Zu diesem Zwecke wurde zunächst eine Pferdefleischbouillon (1:2) mit Peptonzusatz (0,2 Proz.) und unter Hinzufügen von 0,3 Proz. Kochsalz und 0,2 Proz. Natriumphosphat gekocht. Diese Bouillon entsprach einem Alkalitätsgrade von 7,0 p_H. Ein Teil davon wurde durch Hinzufügen von Salzsäure auf den Titer 6,8 p_H, ein anderer vermittelst Natronlauge auf 7,2, ein weiterer auf 7,4—7,6—7,8—8,0—8,2—8,4 p_H gebracht. Es standen schließlich 9 verschiedene Bouillonsorten mit aufsteigenden Alkalitätsgraden zur Verfügung, die in Röhrchen abgefüllt, zweimal sterilisiert und danach nochmals auf p_H geprüft wurden. Es ergab sich dabei, daß die Alkalität in den ersten drei Proben (6,8—7,0—7,2) dieselbe geblieben war, während die vier nächsten 0,1 und die beiden letzten 0,2 p_H verloren hatten. Die neun verschieden alkalisierten Nährböden stellten also eine ansteigende Reihe von 6,8—8,2 p_H dar. Dazu kam noch eine auf 8,4 p_H eingestellte Bouillon von der im übrigen gleichen Beschaffenheit wie die anderen 9 Arten. Von diesen zehn Bouillonsorten wurden je 21 Röhrchen mit 21 verschiedenen Bakterienarten infiziert und das Wachstum makroskopisch und mikroskopisch nach 24 und 48 Stunden beobachtet. Das Ergebnis ist in der Tabelle niedergelegt.

Tabelle.

Bouillon No.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
p^H	6,8	7,0	7,2	7,3	7,5	7,7	7,9	8,0	8,2	8,4
Lackmus	amphoter	amphoter	hellblau	blau	blau	blau	blau	blau	blau	blau
Phenolphthalein	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos	Umschl.	blaßrosa	blaßrosa	rosa	rot
Bakterienwachstum:										
1. Bact. typhi	spärlich	mäßig	gut	gut	gut	gut	gut	mäßig	mäßig	mäßig
2. „ paratyphi A	gut	gut	„	„	„	„	„	gut	„	„
3. „ „ B	mäßig	„	„	„	„	„	„	„	„	„
4. „ enteritidis Gt.	„	„	„	„	„	„	„	„	gut	„
5. „ paratyphi abortus equi	gut	„	„	„	„	„	„	„	„	„
6. „ coli	„	„	„	„	„	„	„	„	„	„
7. „ dysenteriae (Shiga)	mäßig	mäßig	„	„	„	„	„	„	mäßig	„
8. „ dysenteriae (Flexner)	spärlich	„	„	„	„	„	„	„	„	„
9. „ dysenteriae (Y)	„	gut	„	„	„	„	„	„	„	„
10 „ alcaligenes	mäßig	„	„	„	„	„	„	mäßig	spärlich	spärlich
11. „ pyosepticum viscosum	„	„	„	„	„	mäßig	mäßig	„	mäßig	mäßig
12. Staphylococcus pyogenes aureus	gut	„	„	„	„	gut	gut	gut	gut	„
13. Streptococcus pyogenes	spärlich	spärlich	mäßig	mäßig	„	„	mäßig	spärlich	spärlich	spärlich
14. „ equi	mäßig	gut	gut	gut	„	„	gut	gut	mäßig	mäßig
15. Bac. anthracis	„	mäßig	mäßig	mäßig	mäßig	„	„	„	„	spärlich
16. Bact. erysipelatos suum	spärlich	„	gut	gut	gut	„	mäßig	mäßig	„	sehr spärlich
17. Bac. abortus Bang	kein W.	„	„	„	mäßig	mäßig	spärlich	spärlich	spärlich	kein W.
18. „ avisepticus	spärlich	„	mäßig	„	gut	gut	mäßig	mäßig	mäßig	mäßig
19. „ suisepticus	„	„	gut	„	„	„	gut	„	„	„
20. „ vitulisepticus	mäßig	„	„	„	„	mäßig	mäßig	„	„	sehr spärlich
21. „ ovisepticus	„	„	„	„	„	gut	gut	gut	„	mäßig

Daraus ergibt sich, daß die meisten der benutzten Bakterienarten eine ziemliche Wachstumsbreite haben und mit der Alkalität des gewöhnlichen Brunnenwassers (etwa 7,4 p_H) zufrieden sind. Einen etwas stärker alkalischen Nährboden verlangen ein Streptokokkenstamm und der Milzbrandbazillus. Darüber hinaus zeigen die meisten Bakterien gutes Wachstum in einer Alkalität bis 8,0 p_H, ausgenommen sind der Typhusbazillus, Bact. alcaligenes, pyosepticum viscosum, ein Streptococcus, der Schweinerotlaufbazillus, der Bangsche Abortusbazillus und einige Erreger der hämorrhagischen Septikämie. Eine Standardbouillon, die für fast alle im beschriebenen Versuche benutzten Bakterien gute Wachstumsmöglichkeiten bietet, muß daher eine Alkalität von 7,5 p_H aufweisen.

Die Brauchbarkeit der Indikatorenmethode nach Michaelis dürfte durch die angeführten Untersuchungen erwiesen sein und das Augenmerk vieler Bakteriologen auf die chemischen Vorgänge bei der Nährbodenbereitung richten, die bisher häufig dem subjektiven Urteil der Laboratoriumsdiener usw. überlassen war.

Zusammenfassung.

1) Die Alkalitätsprüfung von Nährböden mit m-Nitrophenol nach Michaelis ist einfach auszuführen und den alten Methoden an Genauigkeit überlegen.

2) Die Alkalisierung von Nährbouillon mit Natronlauge nach Zusatz von Kochsalz und Natriumphosphat hat sich gegenüber der mit Soda ebenfalls bewährt.

3) Die Prüfung von 21 bei verschiedener Alkalität gezüchteten Bakterienarten ergab, daß die meisten eine ziemliche Wachstumsbreite haben und daß eine Bouillon von 7,5 p_H fast für alle benutzten Bakterien gute Wachstumsmöglichkeiten bietet.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena. — 4975

Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie

I. Teil: Originale

herausgegeben von:

E. FRIEDBERGER (Greifswald.) **R. KRAUS** (Sao Paolo.) **H. SACHS** (Heidelberg.) **P. UHLENHUTH** (Marburg a. L.)

33. Band, Heft 6.

Mit 3 Abbildungen im Text.



Jena
Verlag von Gustav Fischer
1922

Ausgegeben am 19. Januar 1922.

Inhalt:

Die außerordentlich hohen Korrekturkosten zwingen uns, die Herren Mitarbeiter zu bitten, ihre Manuskripte gut leserlich abzufassen und vor Einreichung genau durchzusehen, d. h. druckfertig abzuschließen, so daß sachliche Aenderungen soweit als nur irgend möglich vermieden werden. Manuskripte sind zu senden an Herrn Prof. Dr. Friedberger, Hygiene-Institut Greifswald, oder an Herrn Prof. Dr. H. Sachs, Krebsinstitut Heidelberg, oder an Herrn Geheimrat Prof. Dr. P. Uhlenhuth, Institut für experimentelle Therapie (Emil v. Behring), Marburg (Lahn).

Die Herausgeber. *Die Verlagsbuchhandlung.*

Die Lehre von der Krebskrankheit

von den ältesten Zeiten bis zur Gegenwart.

Von

Sanitätsrat Prof. Dr. **Jakob Wolff,**
prakt. Arzt in Berlin.

Drei Bände. Mk 332.—, geb. Mk 390.—

Bd. 1: Mit 52 Abbild. im Text. XXXII, 747 S. 1907 Mk 80.—, geb. Mk 98.—

Inhalt: 1. Die Theorie von der Atra bilis. 2. Die Lymphtheorie. (Ende des 17. und 18. Jahrhunderts.) 3. Blastemtheorie. 4. Die Zellularpathologie und ihre Bedeutung für die Krebslehre. 5. Die Embryonaltheorien. 6. Die Zelltheorien. 7. Die parasitären Theorien.

Bd. 2: Mit 1 Abbild. im Text. LXVI, 1261 S. gr. 8⁰ 1911 Mk 144.—, geb. Mk 164.—

Inhalt: 1. Biologische Aetiologie. 1a. Klinische Aetiologie. 2. Präcanceröse lokale Krankheiten. 3. Das Verhältnis der Krebskrankheiten zu anderen Erkrankungen. 4. Spezielle Krebsarten. 5. Allgemeine klinische Erscheinungen der Krebskrankheit. 6. Allgemeine Diagnose des Krebses. 7. Primärkrebs der Verdauungsorgane. 8. Primärkrebs der Atmungsorgane. 9. Primärkrebs des Urogenitalsystems. 10. Primärkrebs der Drüsen und einzelner drüsiger Organe.

Bd. 3, 1. Abtlg.: **Statistik, Tier- und sogenannter Pflanzenkrebs.** Mit 88 Tabellen im Text. XXII, 347 S. gr. 8⁰ 1913 Mk 40.—

Bd. 3, 2. Abtlg.: **Nichtoperative Behandlungsmethoden.** Mit 3 Abbild. im Text. XLV, 618 S. gr. 8⁰ 1914 Mk 68.—
Bd. 3, Teil 1 u. 2 in 1 Bd. geb. Mk 128.—

Münchener med. Wochenschrift. 1915, Nr. 45:

. . . Das Werk bildet wahrlich ein Denkmal deutschen Fleißes und deutscher Gründlichkeit und ist von unschätzbarem Wert für die weitere Krebsforschung. Es gibt aber auch zum ersten Male einen geschlossenen und erschöpfenden Ueberblick über die gewaltige Arbeit, welche auf dem Gebiete der Krebsforschung und -behandlung von den ältesten Zeiten bis auf die Gegenwart geleistet worden ist. . .
G. Hauser.

Schmidts Jahrb. f. d. gesamte Medizin. 1915, August:

. . . Einen besonderen Vorzug bilden die überaus reichen Quellenangaben und das sorgfältige Sachverzeichnis. Das Werk ist nicht bloß für den Historiker und Spezialforscher unentbehrlich, sondern bildet für jeden Arzt eine Fundgrube des Interessanten, zumal neben den ältesten Methoden auch die neuesten Behandlungen mit Elektrizität, mit radioaktiven Substanzen und die biologischen Behandlungsmethoden eingehend berücksichtigt wurden.
Walz-Stuttgart.

Deutsche medizin. Wochenschrift. 1914, Nr. 52:

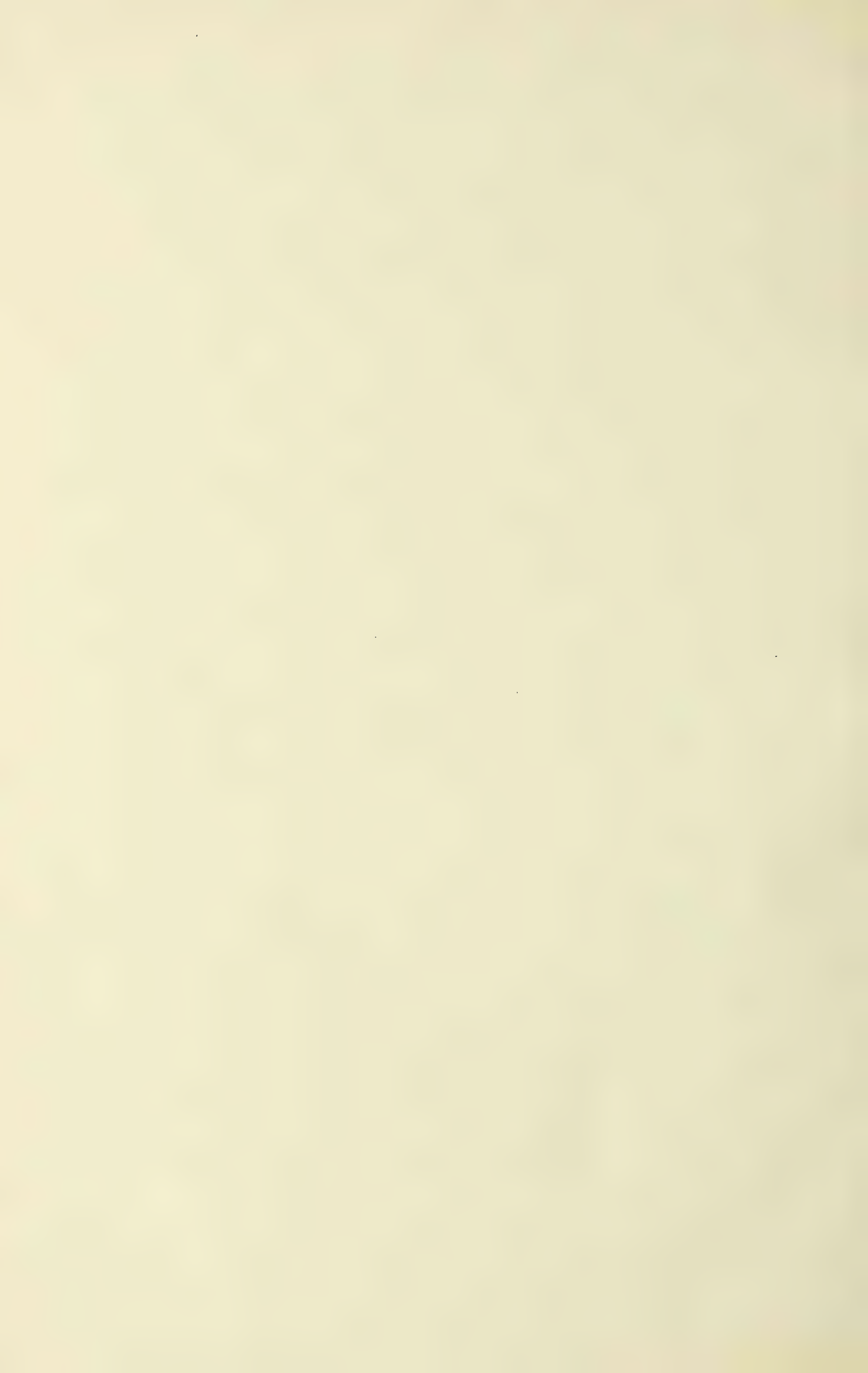
. . . Das mit ungewöhnlicher Arbeitskraft verfaßte Werk wird dauernd eine willkommene Grundlage für den weiteren Ausbau der Lehre von der Krebskrankheit bilden.
Ribbert-Bonn.

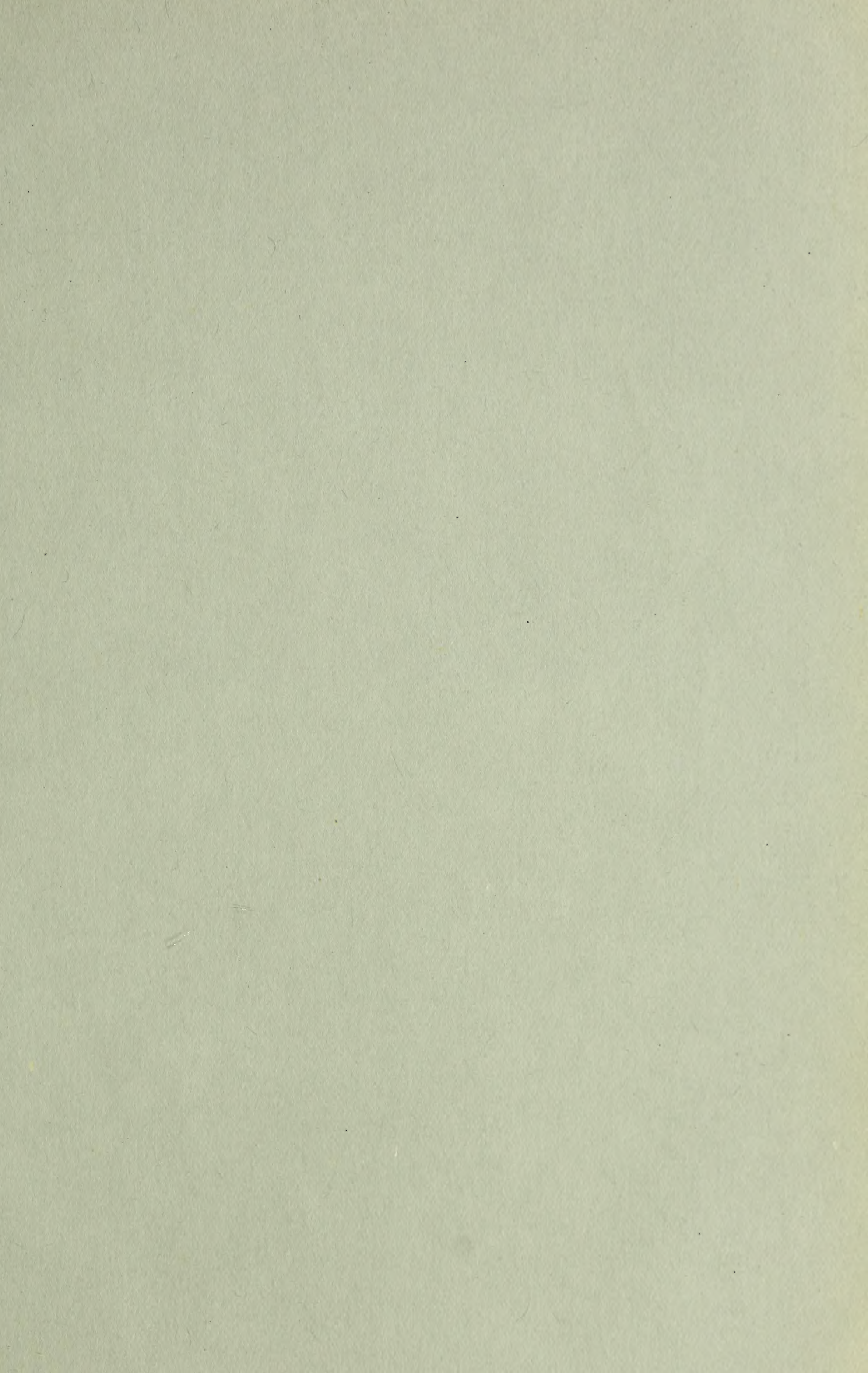
Archiv f. Dermatologie u. Syphilis. Bd. 122, Heft 3:

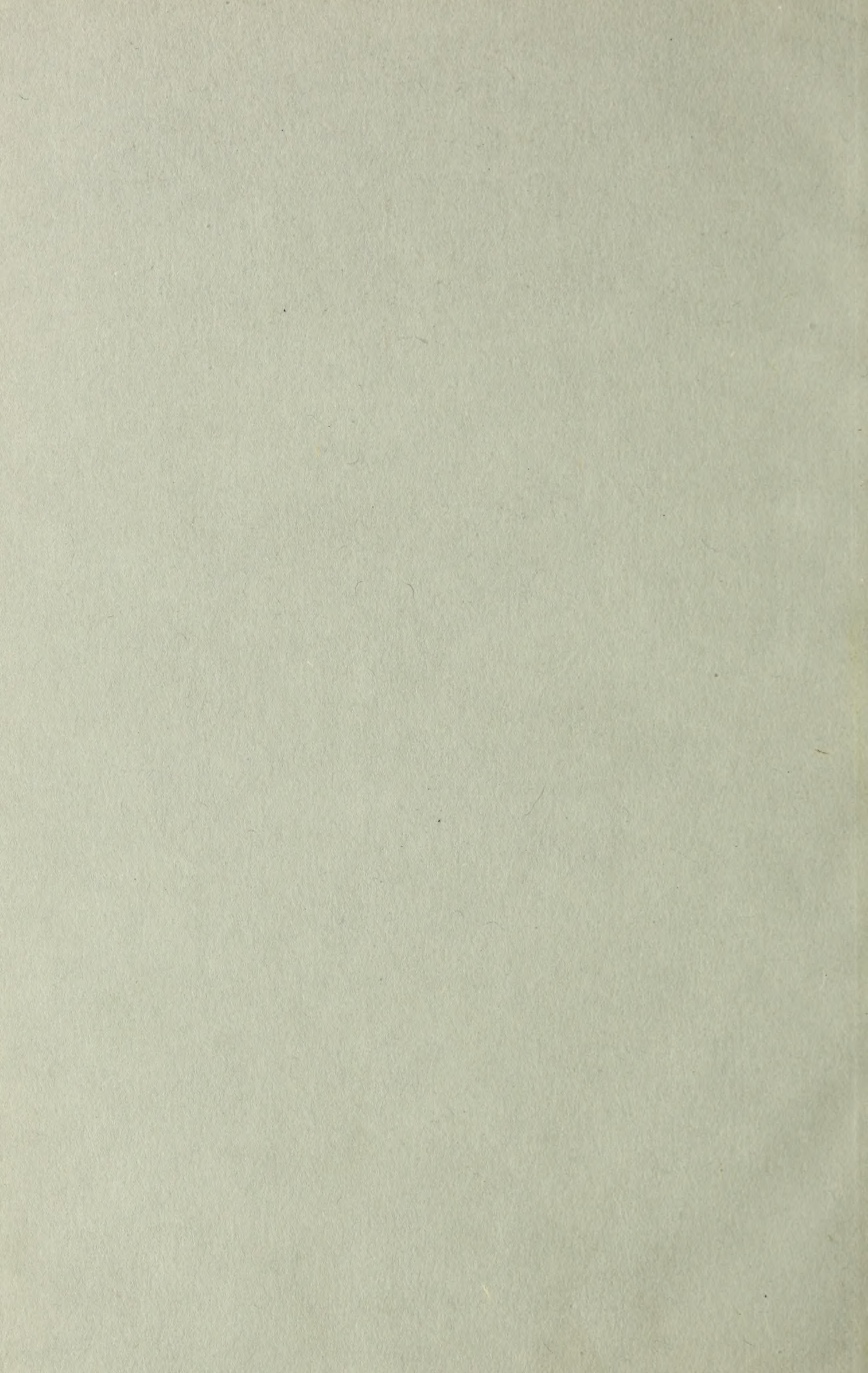
. . . Selbst überall den Quellen nachgehend, hat der Autor ein Quellenwerk geschaffen, das für Arbeiten auf dem Gebiete der Krebskrankheit unentbehrlich ist. . . .
W. Pick-Wien.

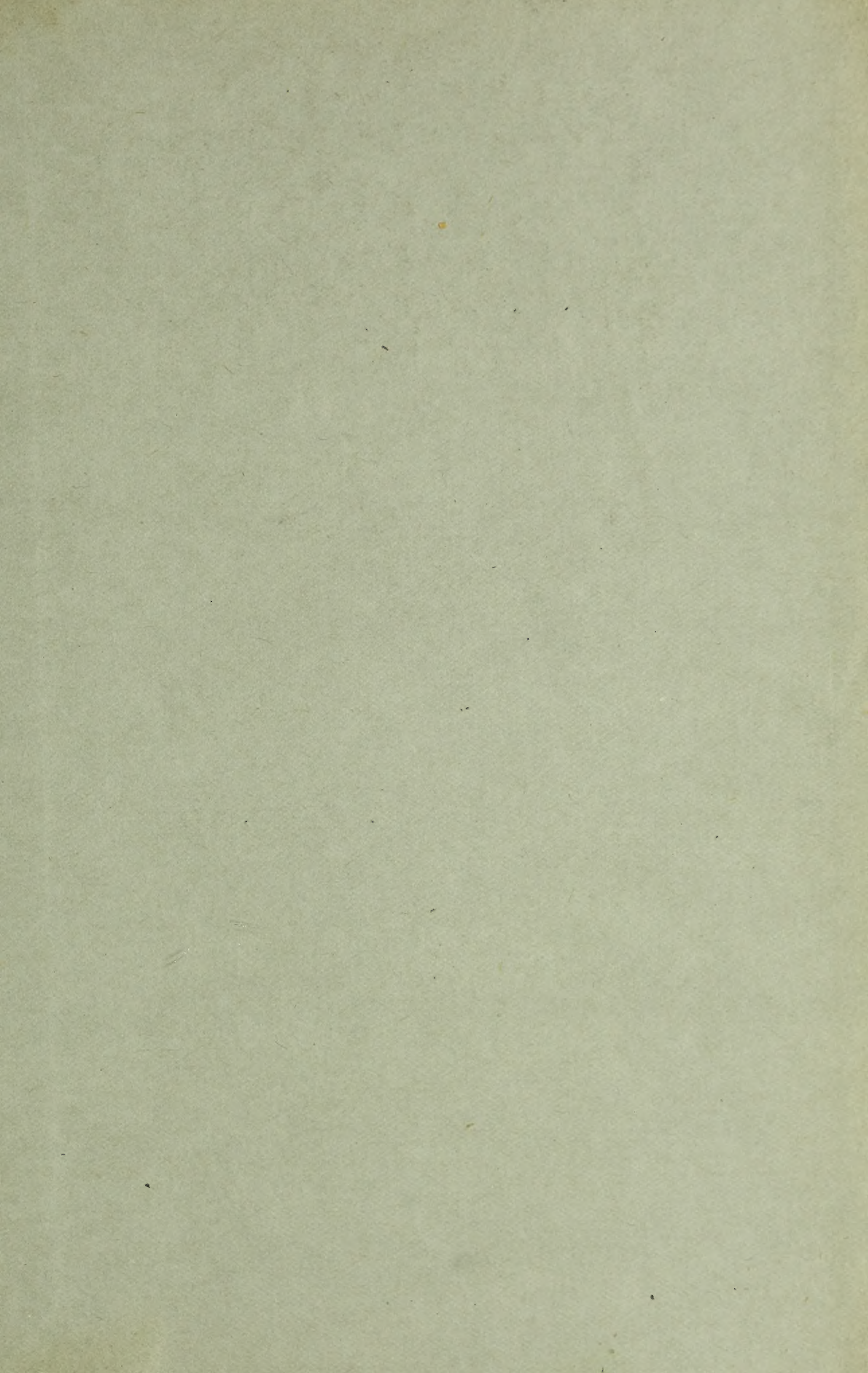
Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) Jena.












3 0112 105326208